JUNQUEIRA · CARNEIRO

BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR



GUANABARA KOOGAN

Biologia Celular e Molecular

L. C. Junqueira

Professor Emérito. Universidade de São Paulo.
Research Associate in Biology (Honorary), Harvard College, Boston.
Formerly Research Associate, Medical School,
University of Chicago.

José Carneiro

Professor de Histologia e Embriologia, Instituto de
Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
Formerly Research Associate, Department of Anatomy,
McGill University, Montreal, Canadá.
Formerly Visiting Associate Professor, Department of
Anatomy, Medical School, University of Virginia,
Charlottesville, Virginia.

Sexta edição

GUANABARA KOOGAN

CONTEÚDO

1

Introdução: Uma Vista Panorâmica sobre a Estrutura, Funções e Evolução das Células

Roteiro

- *Os vírus são constituídos por um genoma de DNA ou de RNA, protegido por monômeros protéicos, que formam o capsômero.*
- *Os vírus só se multiplicam dentro das células: são parasitas intracelulares obrigatórios.*
- *As bactérias do grupo das rickéttsias e clamídias são células procariontes incompletas, que só se multiplicam dentro das células eucariontes.*
- *Só existem dois tipos celulares básicos: as células procariontes e as eucariontes.*
- *As células procariontes são as bactérias. Não possuem núcleo, com o genoma sendo separado do citoplasma por um envoltório.*
- *As células eucariontes, de estrutura muito mais complexa, constituem todos os demais seres vivos.*
- *Células eucariontes são maiores, contêm muito mais DNA, seus cromosomas são complexos, contêm histonas e ficam separados do citoplasma pelo envoltório nuclear.*
- *O citoplasma das células eucariontes é dividido por membranas em compartimentos contendo moléculas distintas e que executam funções especializadas em cada compartimento.*
- *As células eucariontes das plantas têm geralmente um grande vacúolo citoplasmático, apresentam plastos, parede de celulose, armazenam amido como reserva energética e se comunicam por meio de plasmodesmas.*
- *Aspectos da evolução das células; cloroplastos e mitocôndrias provavelmente se originaram de simbiontes.*
- *Correlação dos grandes grupos de seres vivos (moneras, protistas, plantas, fungos e animais) e os tipos celulares básicos.*

Neste capítulo será apresentada uma visão panorâmica, resumida, da estrutura, funções e evolução das células, que servirá de base para o estudo da matéria tratada com mais profundidade nos capítulos seguintes.

A célula é a unidade que constitui os seres vivos, podendo ocorrer isoladamente, nos **seres unicelulares**, ou formar arranjos ordenados, os tecidos, que constituem o corpo dos **seres pluricelulares**. Em geral, os tecidos apresentam quantidades variáveis de **material extracelular**, produzido por suas células.

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios

Devido a suas relações com as células e a seus efeitos sobre estas, podendo causar doenças de gravidade variável, os vírus serão estudados neste livro, embora de modo resumido (Cap. 16). Um vírus não é capaz de se multiplicar, exceto quando parasita uma célula de cujas enzimas se utiliza para a síntese das macromoléculas que vão formar novos vírus. Os vírus não possuem enzimas nem outros elementos estruturais necessários à fabricação de vírus semelhantes. São, portanto, parasitas intracelulares obrigatórios. Na verdade, os vírus são parasitas ao nível molecular, pois induzem a maquinaria sintética das células parasitadas a trabalhar para formar novos vírus, em vez de trabalhar para formar seus próprios componentes.

Os vírus que atacam as células animais não atacam as vegetais, e vice-versa. Distinguem-se, pois, os **vírus animais** e os **vírus vegetais**. Há, porém, alguns vírus vegetais que, invadindo-as, multiplicam-se nas células de insetos disseminadores destes vírus de uma planta para outra. Os vírus das bactérias são chamados **bacteriófagos**, ou simplesmente **fagos**.

Cada vírus é formado basicamente por duas partes: (1ª) uma porção central que leva a informação genética, isto é, um tipo especial de ácido nucléico (ribonucléico ou desoxirribonucléico) no qual estão contidas, em código, todas as informações necessárias para a produção de outros vírus iguais, e (2ª) uma porção periférica, constituída de proteínas, que protege o ácido nucléico, possibilita ao vírus identificar as células que ele pode parasitar e, em certos vírus, facilita a penetração nas células. Alguns vírus contêm ácido ribonucléico (RNA), enquanto outros contêm ácido desoxirribonucléico (DNA). Os dois tipos de ácido nucléico jamais estão presentes no mesmo tipo de vírus.

Certos vírus maiores e mais complexos apresentam um invólucro lipoprotéico. A parte lipídica deste invólucro se origina das membranas celulares. Mas as proteínas (glicoproteínas) são de natureza viral, isto é, são codificadas pelo ácido nucléico do vírus.

Rickéttsias e clamídias são células incompletas

As bactérias dos grupos das rickéttsias e das clamídias são muito pequenas e constituídas por **células incompletas**, que não possuem a capacidade de autoduplicação independente da colaboração de outras células. Como os vírus, as rickéttsias e clamídias são parasitas celulares obrigatórios, pois só proliferam no interior das células completas. Todavia, as células incompletas diferem dos vírus em três aspectos fundamentais. **Em primeiro lugar**, os vírus contêm apenas um tipo de ácido nucléico, que pode ser o ácido ribonucléico (RNA) ou o desoxirribonucléico (DNA), enquanto as células incompletas contêm ao mesmo tempo DNA e RNA. **Em segundo lugar**, os vírus carregam, codificada no seu ácido nucléico, a informação genética para a formação de novos vírus, mas não possuem organelas e por isso se utilizam da maquinaria das células para se multiplicarem. As células incompletas, ao contrário, têm parte da máquina de síntese para se reproduzirem, mas necessitam da suplementação fornecida pelo meio intracelular. **Em terceiro lugar**, as células incompletas têm uma membrana semipermeável, através da qual ocorrem trocas com o meio, o que não acontece com os vírus. O invólucro que alguns vírus possuem e que em parte é constituído de moléculas celulares, perde-se quando os vírus penetram nas células, e não funciona como uma barreira para a penetração ou saída de moléculas.

É provável que as células incompletas tenham tido origem em células "degeneradas", isto é, que, no correr dos anos, perderam parte do seu DNA, de suas enzimas e, portanto, sua autonomia, tornando-se dependentes das células que se conservaram completas.

Existem apenas 2 tipos básicos de células: as procariontes e as eucariontes

A microscopia eletrônica demonstrou que existem fundamentalmente duas classes de células: as **procariontes** (*pro*, primeiro, e *cario*, núcleo), cujos cromosomas não estão separados do citoplasma por membrana, e as **eucariontes** (*eu*, verdadeiro, e *cario*, núcleo), com um núcleo bem individualizado e delimitado pelo envoltório nuclear. Como será visto a seguir, embora a complexidade nuclear seja utilizada para dar nome às duas classes de células, há outras diferenças importantes entre procariontes e eucariontes.

As células procariontes são pobres em membranas

As células procariontes caracterizam-se pela pobreza de membranas, que, nelas, quase se reduzem à membrana plasmática. Ao contrário do que ocorre nas células eucariontes, as procariontes não possuem membranas separando os cromosomas do citoplasma. Os seres vivos que têm células procariontes são denominados **procariotas**, compreendendo as **bactérias** (as **cianofíceas**, ou **algas azuis**, também são bactérias).

A célula procarionte mais bem estudada é a bactéria *Escherichia coli* (Fig. 1.1), que, por sua simplicidade estrutural e rapidez de multiplicação, revelou-se excelente para os estudos de biologia molecular. A *E. coli* tem a forma de bastão, com cerca de 2 μm de comprimento, e é separada do meio externo por uma **membrana plasmática** semelhante à que envolve as células eucariontes. Por fora desta membrana existe uma **parede rígida**, com 20 nm de espessura, constituída por um complexo de proteínas e glicosaminoglicanas. A parede tem sobretudo função de proteção mecânica.

No citoplasma da *E. coli* existem ribosomas ligados às moléculas de RNA mensageiro, constituindo **polirribosomas**. Encontram-se, em geral, dois cromosomas idênticos, circulares, ocupando regiões denominadas **nucleóides** e presos a pontos diferentes da membrana plasmática. Cada cromosoma, constituído de DNA não-associado a histonas, tem espessura de 2 nm e comprimento de 1,2 mm. A *Escherichia coli* pode conter um ou mais cromosomas, porém todos, em uma mesma célula, são sempre idênticos. As células pro-

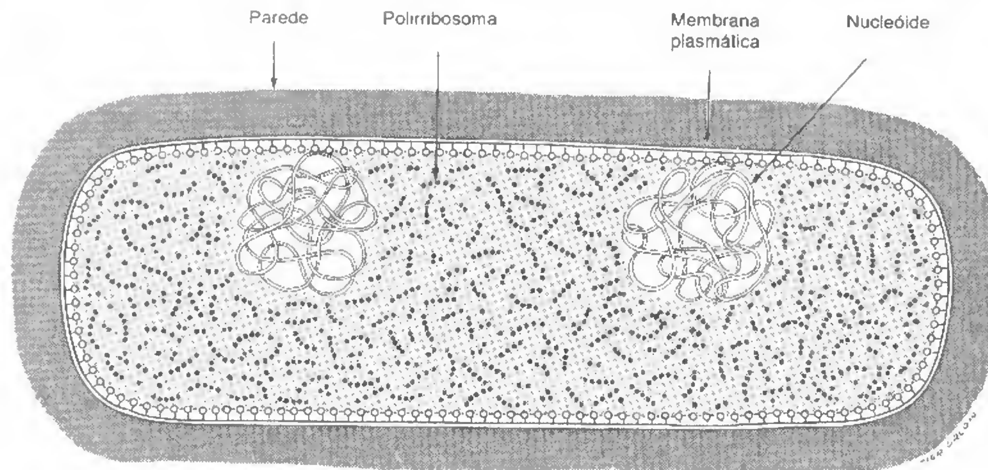


Fig. 1.1 Célula procarionte (bactéria *Escherichia coli*). A célula é envolvida por uma parede rígida presa à membrana plasmática. Na face interna da membrana, encontram-se enzimas relacionadas com a respiração e que estão representadas, no desenho, por pequenas raquetas. O citoplasma contém numerosos polirribosomas, mas não apresenta o sistema de membranas que existe nas células eucariontes. O desenho mostra dois cromosomas, que são idênticos e se prendem à membrana plasmática. A região ocupada pelo cromosoma chama-se **nucleóide**.

cariontes não se dividem por mitose, e seus filamentos de DNA não sofrem o processo de condensação que leva à formação de cromosomas visíveis ao microscópio óptico, durante a divisão celular.

O citoplasma das células procariontes em geral não apresenta outra membrana além daquela que o separa do meio externo (membrana plasmática). Em alguns casos podem existir invaginações da membrana plasmática que penetram no citoplasma, onde se enrolam, originando estruturas denominadas **mesosomas**. Além disso, no citoplasma das células procariontes que realizam a fotossíntese, existem algumas membranas, paralelas entre si, e associadas à clorofila ou a outros pigmentos responsáveis pela captação da energia luminosa.

Outra diferença entre a célula procarionte e a eucarionte é a falta de um citoesqueleto nas células procariontes. Nas eucariontes, o citoesqueleto é responsável pelos movimentos e pela forma das células, que, muitas vezes, é complexa. A forma simples das células procariontes, em geral esférica ou em bastonete, é mantida pela **parede extracelular**, sintetizada no citoplasma e agregada à superfície externa da membrana celular. Esta parede é rígida e tem também papel importante na proteção da célula bacteriana, diante das variações do meio ambiente onde ela se encontra na natureza.

Todavia, a diferença mais marcante entre as células procariontes e as eucariontes é a pobreza de membranas nas procariontes. O citoplasma das células procariontes não se apresenta subdividido em compartimentos, ao contrário do que ocorre nas células eucariontes, onde um extenso sistema de membrana cria no citoplasma microrregiões (Fig. 1.2) que contêm moléculas diferentes e executam funções especializadas.

As células eucariontes são compartimentadas

Estas células apresentam duas partes morfologicamente bem distintas — o **citoplasma** e o **núcleo** — entre as quais existe um trânsito constante de moléculas diversas, nos dois sentidos. O citoplasma é envolto pela **membrana plasmática**, e o núcleo, pelo **envoltório nuclear**.

Uma característica importante das células eucariontes é sua riqueza em membranas, formando compartimentos que separam os diversos processos metabólicos graças ao direcionamento das moléculas absorvidas e às diferenças enzimáticas entre as membranas dos vários compartimentos. A célula eucarionte é como uma fábrica organizada em seções de montagem, pintura, embalagem etc. Além de aumentar a eficiência, a separação das atividades permite que as células eucariontes atinjam maior tamanho, sem prejuízo de suas funções.

O citoplasma é constituído pela matriz, organelas e depósitos diversos

O citoplasma das células eucariontes contém as organelas, como mitocôndrias, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, lisosomas e peroxisomas, e pode apresentar depósitos de substâncias diversas, como grânulos de glicogênio e gotículas lipídicas. Preenchendo o espaço entre essas estruturas, encontra-se a **matriz citoplasmática**, **hialoplasma** ou **citosol**. O citosol contém moléculas de água, íons diversos, aminoácidos, precursores dos ácidos nucléicos, numerosas enzimas que participam da degradação e síntese de hidratos de carbono, de ácidos graxos, de aminoácidos e de outras moléculas produzidas nas células. Contém ainda monômeros protéicos que se polimerizam para constituir diversas estruturas celulares como os microtúbulos e os filamentos de actina, que são componentes do citoesqueleto. O estudo estrutural da matriz citoplasmática é tecnicamente difícil, porém cada vez parece mais claro que ela é formada principalmente por componentes fibrilares e microtubulares que se podem despolimerizar e polimerizar novamente, de modo reversível, o que explica as modificações de sol para gel e vice-versa observadas no citoplasma.

Membrana plasmática

É a parte mais externa do citoplasma e, portanto, separa-o do meio extracelular. Tem cerca de 7 a 10 nm de espessura e apare-

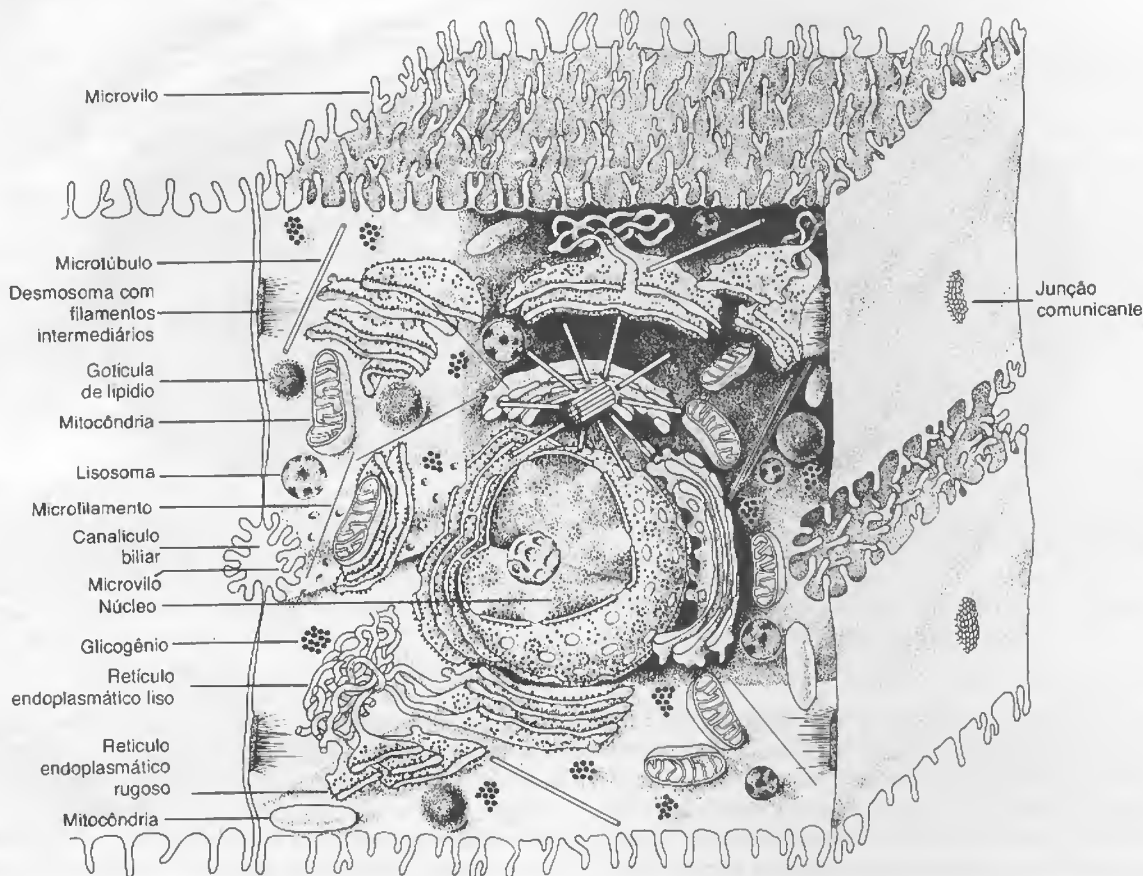


Fig. 1.2 Representação tridimensional de célula eucarionte animal (célula do fígado). O núcleo é separado do citoplasma pelo envelope nuclear, de dupla membrana, com poros. O citoplasma das células eucariontes possui um sistema de membranas muito desenvolvido e que, por razões didáticas, só está parcialmente representado nesta figura. Observar, acima do núcleo, um dos dois centríolos da célula, de onde irradiam microtúbulos. Atrás dos centríolos está o aparelho de Golgi. No centro do núcleo aparece o nucléolo. (Reproduzido, com permissão, de Carneiro, J: Bases Celulares para a Fisiopatologia. *In:* Marcondes, M. *et al. Clínica Médica,* 3ª edição. Guanabara Koogan, 1984.)

ce nas eletromicrografias como duas linhas escuras separadas por uma linha central clara. Esta estrutura trilaminar é comum às outras membranas encontradas nas células, sendo por isso chamada **unidade de membrana** ou **membrana unitária**.

Mitocôndrias

São corpúsculos esféricos ou, mais freqüentemente, alongados (Fig. 1.2). Nas micrografias eletrônicas aparecem constituídas por duas unidades de membrana, sendo a interna pregueada, originando dobras em forma de prateleiras ou de túbulos (Fig. 1.3).

A principal função das mitocôndrias é liberar energia gradualmente das moléculas de ácidos graxos e glicose, provenientes dos alimentos, produzindo calor e, principalmente, moléculas de ATP (adenosina-trifosfato). A energia armazenada no ATP é usada pelas células para realizar suas diversas atividades, como movimentação, secreção, multiplicação etc. As mitocôndrias participam também de outros processos metabólicos, muito variáveis conforme o tipo celular, e que serão estudados oportunamente.

Retículo endoplasmático

No citoplasma das células eucariontes existe uma rede de vesículas achatadas, vesículas esféricas e túbulos que se intercomunicam. Estes elementos possuem uma parede formada por uma unidade de membrana que delimita cavidades, as **cisternas do retículo endoplasmático** (Fig. 1.3). As cisternas constituem um sistema de túneis, de forma muito variável, que percorre o citoplasma. Distinguem-se o retículo endoplasmático **rugoso**, ou **granular**, e o **liso** (Fig. 1.2).

O retículo endoplasmático rugoso é assim chamado por conter, na sua superfície, partículas muito densas aos elétrons: os ribosomas, ricos em ribonucleoproteínas. Os ribosomas têm um diâmetro de 15 a 20 nm. Cada um é formado por duas subunidades de tamanhos diferentes, somente visíveis nas micrografias eletrônicas de grande resolução.

Os ribosomas se associam a filamentos de RNA mensageiro (mRNA), formando polirribosomas que ficam dispersos no citoplasma ou presos à superfície externa do retículo endoplasmático rugoso. Os polirribosomas têm papel fundamental na síntese de proteínas.

O retículo endoplasmático liso apresenta-se principalmente como túbulos que se anastomosam (Fig. 1.2). É muito desenvolvido em certos tipos de células, como, por exemplo, nas que secretam hormônios esteróides, nas células hepáticas e no músculo estriado.

Aparelho de Golgi

Esta organela é também conhecida como **zona** ou **complexo de Golgi**.

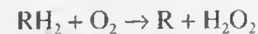
O aparelho de Golgi é constituído por um número variável de vesículas circulares achatadas e por vesículas esféricas de diversos tamanhos, que parecem brotar das primeiras (Figs. 1.2 e 1.4). Em muitas células, o aparelho de Golgi localiza-se em posição constante, quase sempre ao lado do núcleo (Figs. 1.2 e 1.5); em outras células, ele se encontra disperso pelo citoplasma.

Lisosomas

São organelas de forma e tamanho muito variáveis, freqüentemente medindo 0,5-3,0 µm de diâmetro (Figs. 1.2 e 1.5) e contendo diversas enzimas hidrolíticas, com atividade máxima em pH ácido. Essas enzimas são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso. Desse modo, os lisosomas são apenas depósitos de enzimas utilizadas pelas células para digerir ou partículas fagocitadas, ou, então, suas próprias organelas. A destruição e renovação de organelas é um processo fisiológico que permite à célula manter seus componentes em bom estado funcional e em quantidade adequada às suas necessidades do momento.

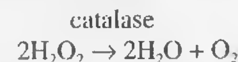
Peroxisomas

Os **peroxisomas** (microcorpos) são organelas caracterizadas pela presença de enzimas oxidativas que transferem átomos de hidrogênio de diversos substratos para o oxigênio, segundo a reação:



$$RH_2 + O_2 \rightarrow R + H_2O_2$$

Outra característica funcional dos peroxisomas é conterem a maior parte da catalase celular (Fig. 1.6), enzima que converte peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio:



$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O + O_2$$

A atividade da catalase é importante porque o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que se forma nos peroxisomas é um oxidante enérgico e prejudicaria a célula se não fosse eliminado rapidamente.

Os peroxisomas apresentam, ao microscópio eletrônico, uma matriz granulosa envolta por membrana, e seu tamanho em ge-



Fig. 1.3 Eletromicrografia de parte do citoplasma de uma célula do tecido conjuntivo (plasmócito). Os corpos mais escuros e alongados são mitocôndrias. Essa célula, especializada na síntese de proteínas, é muito rica em retículo endoplasmático rugoso (REG). As cisternas estão dilatadas por proteínas que serão secretadas no meio extracelular. As proteínas aparecem sob a forma de um precipitado fino e claro, no interior das cisternas do retículo endoplasmático rugoso. Aumento: 60.000 ×.

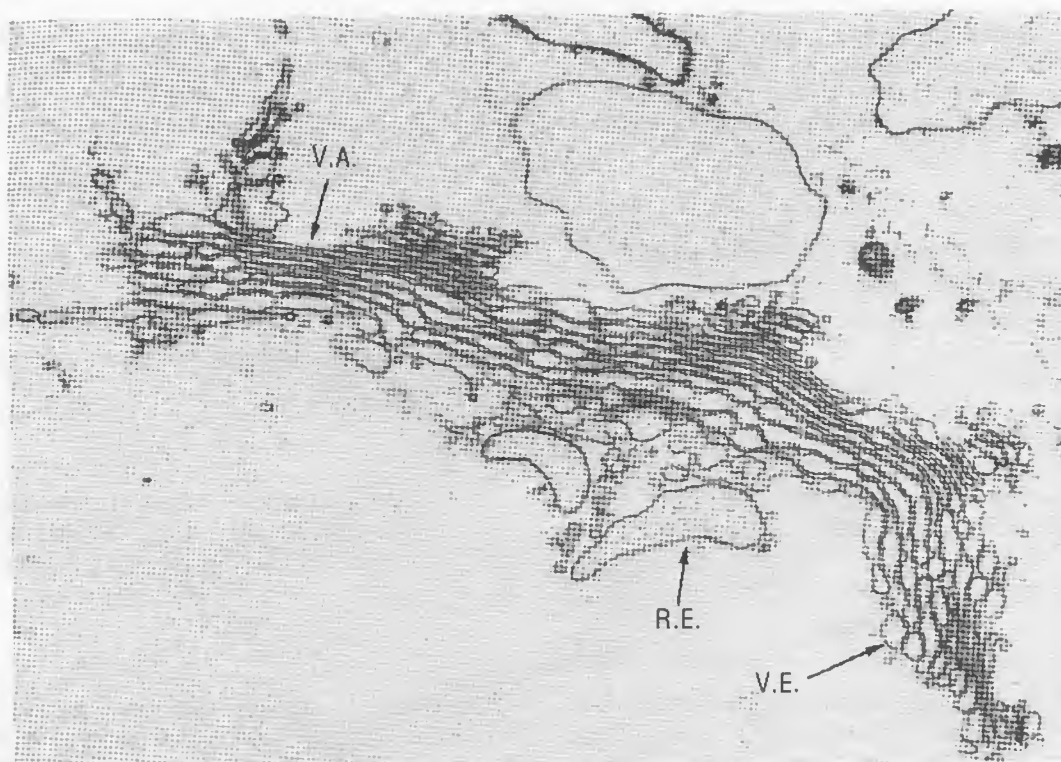


Fig. 1.4 Eletromicrografia do aparelho de Golgi isolado de célula do intestino. Essa organela é constituída de vesículas achatadas (VA) e vesículas esféricas (VE) que parecem brotar daquelas. Notar, também, alguns fragmentos do retículo endoplasmático liso, um dos quais está assinalado (RE). Aumento: 25.000 ×.

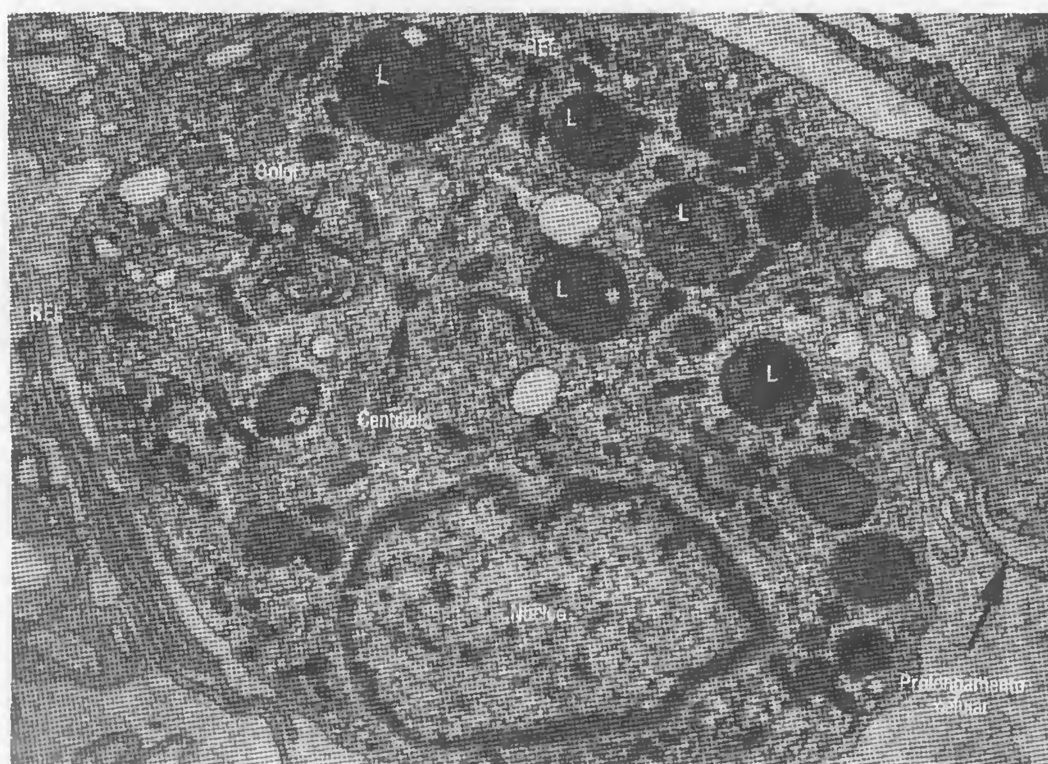


Fig. 1.5 Eletromicrografia de célula do tecido conjuntivo (macrófago). Em alguns pontos, a superfície celular apresenta irregularidades sob a forma de prolongamentos. Observar o núcleo (o nucléolo não aparece no corte), o aparelho de Golgi, os lisosomas (L), o retículo endoplasmático liso (REL) e o centríolo. Aumento: 15.000 ×.

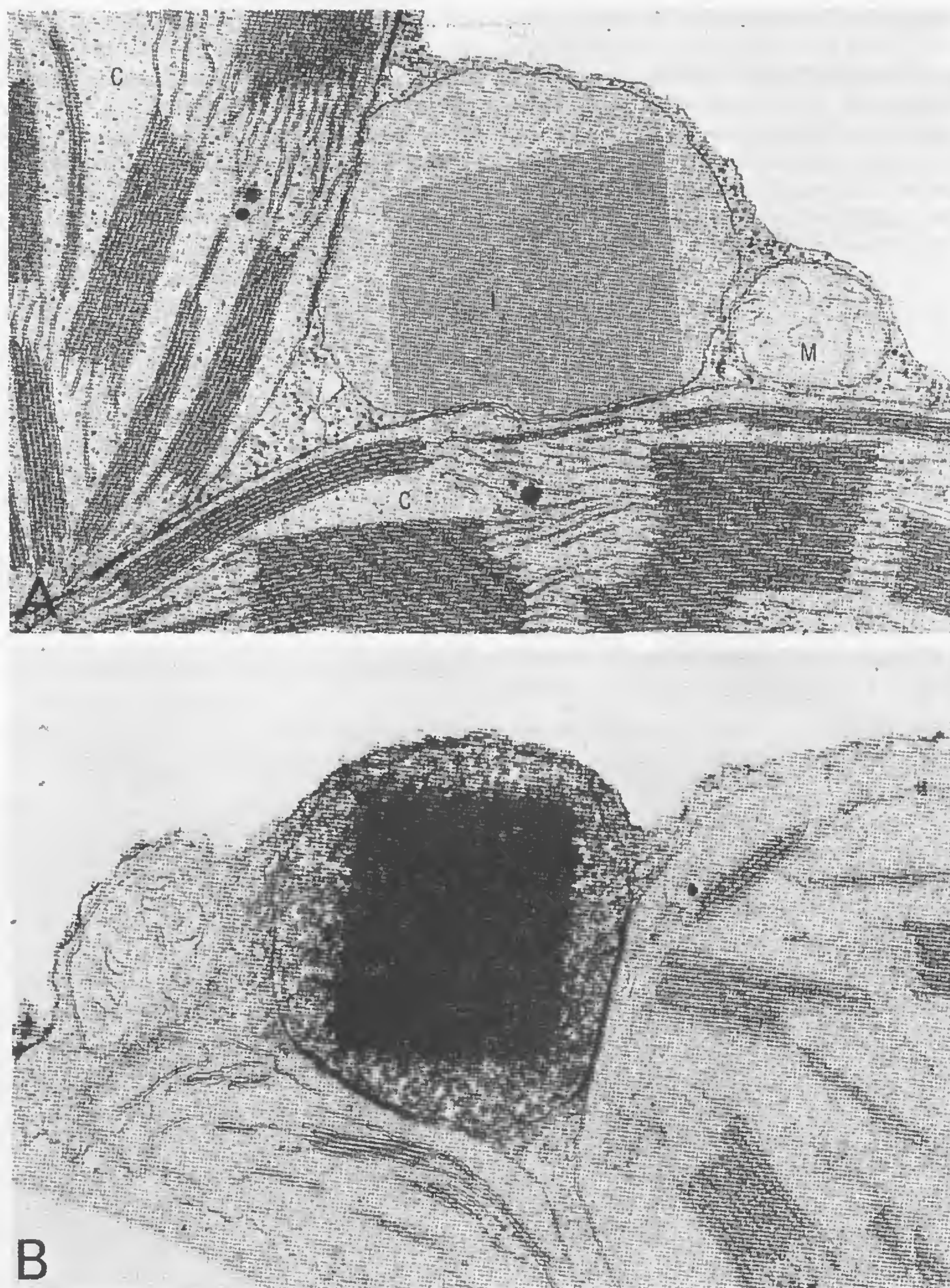


Fig. 1.6 A. Micrografia eletrônica de folha de fumo, mostrando um peroxisoma com sua membrana e contendo uma matriz amorfa, em cujo interior nota-se uma inclusão cristalina (I). Observe ainda dois cloroplastos (C) e uma mitocôndria (M). 51.000 ×. **B**. Micrografia eletrônica de folha de fumo após realização de uma técnica citoquímica para catalase. Observar a reação positiva para catalase (depósito elétron-denso) no peroxisoma. A catalase localiza-se na matriz amorfa do peroxisoma e na inclusão cristalina nele contida. 44.000 ×. (Frederick, S. E. and E. H. Newcomb. *J. Cell Biol.*, *43*:343, 1969. Reproduzido com permissão.)

ral varia de 0,3 a 1 µm. Em muitos tipos celulares, os peroxisomas com estas dimensões exibem um cristalóide, elétron-denso e constituído de catalase. Existem peroxisomas menores, largamente distribuídos em muitos tipos celulares, medindo apenas 100 a 200 nm, denominados **microperoxisomas**. No entanto, embora sejam encontrados em menor número de tipos celulares, os peroxisomas maiores são mais bem estudados, por serem mais fáceis de isolar pela técnica de centrifugação fracionada. Os peroxisomas em geral, incluindo os microperoxisomas, são identificados com segurança ao microscópio eletrônico por darem reação positiva para a enzima catalase.

Os glioxisomas são peroxisomas especializados

Os **glioxisomas** são peroxisomas encontrados em certos protistas (*Euglena, Tetrahymena*) e sementes oleaginosas de vegetais superiores. Contêm principalmente as enzimas do ciclo do ácido glioxílico, que participam da síntese de hidratos de carbono a partir de triglicerídeos acumulados nas sementes, ou então de acetato, no caso dos protistas. Basicamente, a função do ciclo do ácido glioxílico é produzir, a partir de acetato, o metabólito succinato, utilizado pela célula para a síntese de hidratos de carbono. Estes hidratos de carbono são usados como fonte de energia pela semente durante a germinação e para as necessidades energéticas usuais dos protistas.

Os peroxisomas das folhas das plantas participam, junto com os cloroplastos, da fotorrespiração

A fotorrespiração é um processo de oxidação de compostos resultantes da atividade fotossintética dos cloroplastos, formando principalmente hidratos de carbono como produto final. Na fotorrespiração há consumo de oxigênio e produção de gás carbônico. Estes peroxisomas possuem, entre outras enzimas, catalase, enzimas da β-oxidação dos ácidos graxos e ácido glicólico-oxidase.

Peroxisomas animais

São largamente distribuídos, tendo sido bem estudados nas células do rim e do fígado de mamíferos. Entre outras enzimas, contêm catalase, enzimas da β-oxidação dos ácidos graxos, urato-oxidase e D-aminoácido-oxidase. Participam da metabolização do ácido úrico, resultante das bases púricas, formando alantoína. A presença da enzima D-aminoácido-oxidase está provavelmente relacionada com a metabolização dos D-aminoácidos da parede das bactérias que penetram no organismo, pois nos mamíferos existem apenas L-aminoácidos. Os peroxisomas dos animais têm também um papel na desintoxicação. Por exemplo, cerca da metade do etanol consumido por uma pessoa é oxidado pelos peroxisomas, principalmente os hepáticos e renais. Os peroxisomas participam, como as mitocôndrias, da β-oxidação dos ácidos graxos, assim chamada porque os ácidos graxos são rompidos no carbono da posição dois ou beta. Os peroxisomas catalisam a degradação dos ácidos graxos, produzindo acetil-CoA, que pode penetrar nas mitocôndrias, onde vai participar da síntese de ATP através do ciclo do ácido cítrico, ou então ser utilizado em outros compartimentos citoplasmáticos para a síntese de moléculas diversas. Calcula-se que 30% dos ácidos graxos sejam oxidados em acetil-CoA nos peroxisomas.

Receptores da membrana dos peroxisomas captam proteínas sintetizadas no citosol e que contêm um sinal específico

Os peroxisomas crescem pela incorporação de proteínas sintetizadas nos polirribosomas livres no citosol, e que contêm uma seqüência especial de três aminoácidos próximos à extremidade carboxila da molécula protéica. Esta seqüência é reconhecida por receptores da membrana e a proteína é transportada para o interior dos peroxisomas. Assim, os peroxisomas crescem e, após atingirem certo tamanho, dividem-se por fissão (Fig. 1.7). O processo foi bem estudado tomando-se como modelo a catalase. Cada molécula da catalase é constituída de quatro polipeptídeos idênticos, cada um deles ligado a um grupo heme. A catalase é liberada pelos polirribosomas no citosol sob a forma de polipeptídeos, sem o grupo heme, denominados apocatalase. As moléculas de apocatalase, que contêm o sinal para os peroxisomas, são reconhecidas pela membrana dos peroxisomas e penetram na organela, onde se unem para formar os tetrâmeros que, em seguida, recebem quatro grupos heme.

As moléculas receptoras, que ficam presas nas membranas dos peroxisomas, fazendo saliência na face citoplasmática, também são sintetizadas nos polirribosomas livres e captadas — porém não introduzidas — nos peroxisomas.

Citoesqueleto

Muitas células têm forma irregular, existindo algumas, como os neurônios ou células nervosas, com prolongamentos muito longos. Além disso, o núcleo, organelas, grânulos de secreção e outros componentes celulares têm localização definida, quase sempre constante, conforme o tipo celular. Essas observações levaram os citologistas a admitir a existência de um **citoesque-**

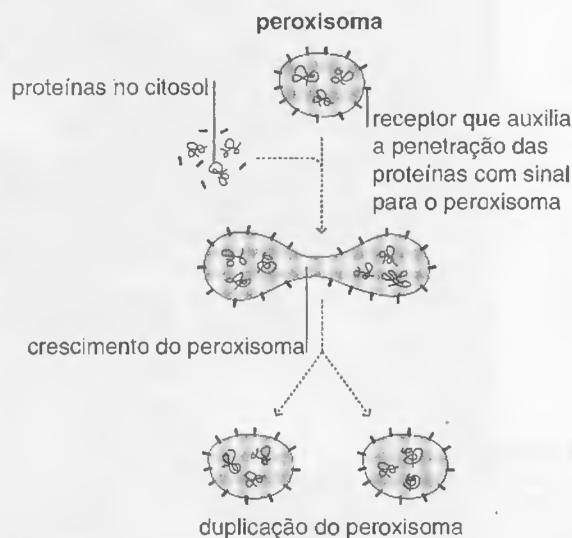


Fig. 1.7 Os peroxisomas se multiplicam por um processo ainda pouco conhecido de divisão binária. O desenho mostra que as proteínas para essa organela são sintetizadas no citosol. Algumas ficam presas à membrana do peroxisoma, porém determinadas proteínas têm sinal peptídico para o interior do peroxisoma. Essas moléculas protéicas atravessam a membrana e vão aumentar o tamanho da organela, que, finalmente, se divide em duas.

leto que desempenharia apenas um papel mecânico, de suporte, mantendo a forma celular e a posição de seus componentes. Estudos posteriores, além de confirmarem a existência do citoesqueleto, mostraram que seu papel funcional é muito mais amplo. Ele estabelece, modifica e mantém a forma das células. É responsável também pelos movimentos celulares como contração, formação de pseudópodos e deslocamentos intracelulares de organelas, cromosomas, vesículas e grânulos diversos. Os principais elementos do citoesqueleto são os **microtúbulos**, **microfilamentos de actina** e **filamentos intermediários**.

Depósitos citoplasmáticos

O citoplasma pode conter, conforme o tipo celular estudado e seu estado funcional, acúmulos de substâncias diversas.

São freqüentes os depósitos do polissacarídeo **glicogênio**, existente nas células sob a forma de grânulos com 30 nm, que podem aparecer isoladamente ou agrupados, constituindo "rosetas" (Fig. 1.8). O glicogênio, um polímero da glicose, é uma reserva energética para as células animais. Muitas células contêm **gotículas lipídicas** (Fig. 1.9) de constituição química e tamanho muito variáveis. Como exemplos de células com muitas gotículas de lipídios, podem ser citadas as células da camada cortical da glândula supra-renal, as células adiposas e as células intersticiais do testículo.

Depósitos de **pigmentos** também não são raros. Um exemplo é a **melanina**, encontrada nos cromatóforos e em outras células. Outro exemplo que pode ser citado é a **lipofuscina**, pigmento pardo que se acumula em algumas células de vida longa, como neurônios e fibras musculares cardíacas, à medida que elas envelhecem.

Os depósitos contendo pigmento são, em parte, responsáveis pela cor dos seres vivos, com implicações nos processos de mimetismo, nas atividades sexuais e na proteção contra as radiações ultravioleta. Nesta última função, a melanina tem papel relevante, pois, nos mamíferos, ela se dispõe como um capuz sobre o núcleo das células da epiderme, protegendo o DNA nuclear do efeito mutagênico dos raios ultravioleta do Sol. Este efeito explica a alta incidência de cânceres da epiderme em pessoas de pele muito clara, que contém pouca melanina, e nos albinos, que são inteiramente desprovidos de melanina.

O núcleo contém os cromosomas e é separado do citoplasma por membrana dupla, o envoltório nuclear

Uma das principais características da célula eucarionte é a presença de um núcleo de forma variável, porém bem individualizado e separado do restante da célula por duas membranas. Todavia, essa membrana dupla, chamada **envoltório nuclear**, possui poros que regulam as trocas de macromoléculas com o

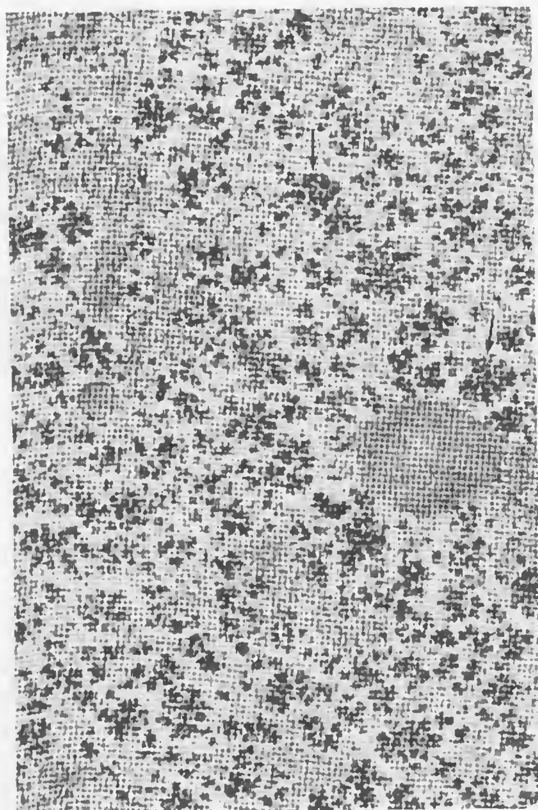


Fig. 1.8 Micrografia eletrônica mostrando grânulos de glicogênio, a maioria dos quais aparece sob a forma de aglomerados denominados "rosetas" (setas). Célula do fígado de rato. Aumento: 62.000 ×.

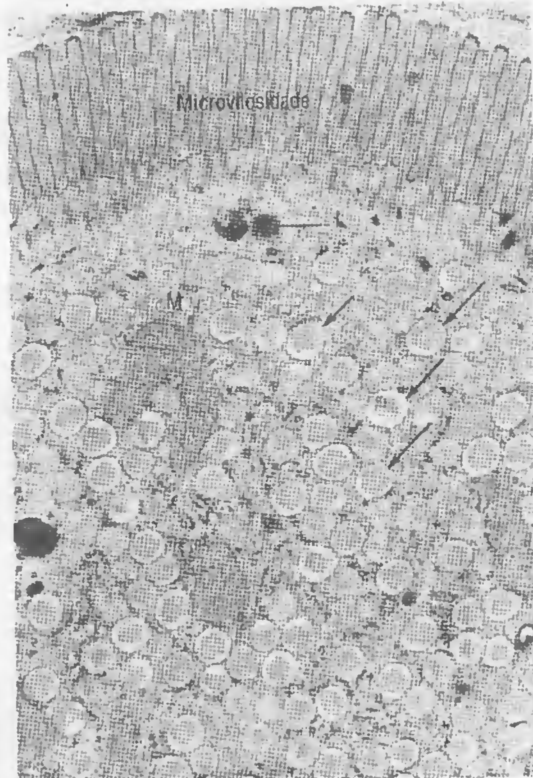


Fig. 1.9 Eletromicrografia mostrando inclusões lipídicas em células de revestimento do intestino delgado. Essas células apresentam, em sua superfície livre, numerosos prolongamentos: os microvilos ou microvilosidades. Notar mitocôndrias (M) e lisosomas (L). As gotículas contendo lipídios são envoltas por membranas do retículo endoplasmático liso (setas). Aumento: 10.000 ×. (Cortesia de H. I. Friedman.)

citoplasma. A membrana externa do envoltório nuclear contém ribosomas e é contínua com o retículo endoplasmático rugoso (Fig. 1.2).

Cromatina

A observação microscópica dos preparados fixados mostra que o núcleo celular contém grânulos de tamanho variável e forma irregular, que se coram intensamente por corantes básicos. O material que constitui estes grânulos foi chamado de cromatina, numa época em que nada se conhecia sobre a sua constituição química. Hoje se sabe que a cromatina é constituída por ácido desoxirribonucléico (DNA) associado a proteínas. As células eucariontes contêm uma quantidade muito maior de DNA, que apresenta grande complexidade, estando associado a proteínas especiais, as histonas. Estas proteínas têm importante papel na organização do DNA, tanto no núcleo interfásico, isto é, que não está em mitose, como na condensação dos cromosomas durante a divisão celular.

Nucléolo

Os nucléolos são corpúsculos em geral esféricos, facilmente identificáveis, embora sua morfologia e estrutura interna sejam variáveis de acordo com o tipo celular. Eles são facilmente visíveis em células vivas, examinadas ao microscópio sem qualquer coloração.

Os nucléolos contêm quantidades variáveis de ácido ribonucléico (RNA) e de proteínas básicas. Geralmente os nucléolos são basófilos devido ao RNA, que se cora por corantes básicos. Contudo, os que apresentam elevado teor de proteínas básicas, que têm afinidade pelos corantes ácidos, são acidófilos (o significado da **basofilia** e da **acidofilia** será explicado no Cap. 2).

O nucléolo só é visível no núcleo interfásico (núcleo que não está em mitose), pois desaparece na prófase, só reaparecendo na telófase.

Características que distinguem as células eucariontes vegetais das animais

As células dos vegetais superiores (plantas) são eucariontes e assemelham-se, em sua estrutura básica, às células animais. As principais diferenças serão citadas a seguir, e, para maiores detalhes, deve ser consultado o Cap. 12.

1. Presença de paredes. Além da membrana plasmática, as células das plantas contêm uma ou mais paredes rígidas que lhes conferem forma constante e protegem o citoplasma contra agressões mecânicas, ação de parasitas etc.

2. Presença de plastos. Uma das principais características das células das plantas é a presença dos plastos, que são organelas maiores do que as mitocôndrias e, como elas, delimitadas por duas unidades de membrana. Quando estas organelas não contêm pigmentos, são chamadas **leucoplastos**. As que contêm pigmentos são os **cromoplastos**, dos quais os mais freqüentes são os **cloroplastos**, ricos em clorofila, principal pigmento fotossintético.

3. Vacúolos citoplasmáticos. As células das plantas contêm, com freqüência, vacúolos citoplasmáticos muito maiores do que os que existem no citoplasma das células animais. Os vacúolos das células vegetais podem ocupar a maior parte do volume celular, reduzindo-se o citoplasma funcional a uma delgada faixa na periferia da célula.

4. Presença de amido. Ao contrário das células eucariontes animais, que utilizam o polissacarídeo glicogênio como reserva energética, nas células das plantas o polissacarídeo de reserva é o amido.

5. Presença de plasmodesmos. As células vegetais possuem tubos com 20-40 nm de diâmetro ligando células vizinhas. Estas conexões são chamadas **plasmodesmos** e estabelecem canais para o trânsito de moléculas. As células animais não apresentam plasmodesmos. Apenas células de certos tecidos se comunicam pelas **junções comunicantes** (v. Cap. 5).

Origem e evolução das células

Admite-se que o processo evolutivo que originou as primeiras células começou na Terra a aproximadamente 4 bilhões de anos (Fig. 1.10). Naquela época, a atmosfera provavelmente continha vapor d'água, amônia, metano, hidrogênio, sulfeto de hidrogênio e gás carbônico. O oxigênio livre só apareceu muito depois, graças à atividade fotossintética das células autotróficas.

Há 4 bilhões de anos, a superfície da Terra estaria coberta por grande quantidade de água, disposta em grandes "oceanos" e

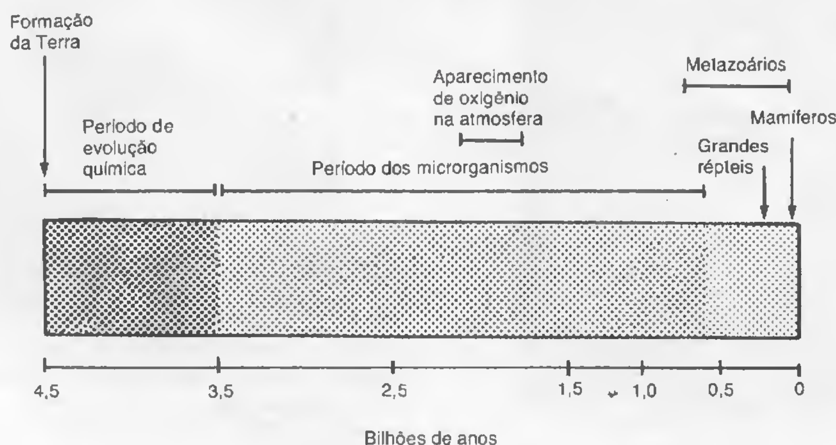


Fig. 1.10 Cronologia da origem da vida na Terra, mostrando as prováveis épocas do aparecimento das primeiras células (microrganismos), precedido pelo período de evolução química, quando houve síntese pré-biótica de moléculas contendo carbono. Observar também a época do aparecimento de oxigênio na atmosfera e o aparecimento dos metazoários e sua evolução recente.

"lagoas". Essa massa líquida, chamada de **caldo primordial**, era rica em moléculas inorgânicas e continha em solução os gases que constituíam a atmosfera. Sob a ação do calor e da radiação ultravioleta, vindos do Sol, e de descargas elétricas, oriundas das tempestades, então muito freqüentes, as moléculas dissolvidas no caldo primordial combinaram-se quimicamente para constituírem os primeiros compostos contendo carbono. Substâncias relativamente complexas como proteínas e ácidos nucléicos, que, nas condições terrestres atuais, só se formam pela ação das células ou por síntese nos laboratórios químicos, teriam aparecido espontaneamente, ao acaso. Esse tipo de síntese, realizada sem a participação de seres vivos, é denominada **prebiótica**, e já foi demonstrado experimentalmente que ela é possível (Fig. 1.11). O acúmulo gradual dos compostos de carbono foi favorecido por três circunstâncias: (1) a enorme extensão da Terra, com grande variedade de nichos, onde provavelmente ocorreu a formação de moléculas que foram mantidas próximas umas das outras e, certamente, diferentes das existentes em outros locais; (2) o longo tempo, cerca de 2 bilhões de anos, período em que ocorreu a síntese prebiótica no caldo primordial; e (3) a ausência de oxigênio na atmosfera, já mencionada, e importante porque assim as moléculas neoformadas não foram logo destruídas por oxidação. Na atmosfera atual da Terra, a síntese do tipo prebiótico é impossível.

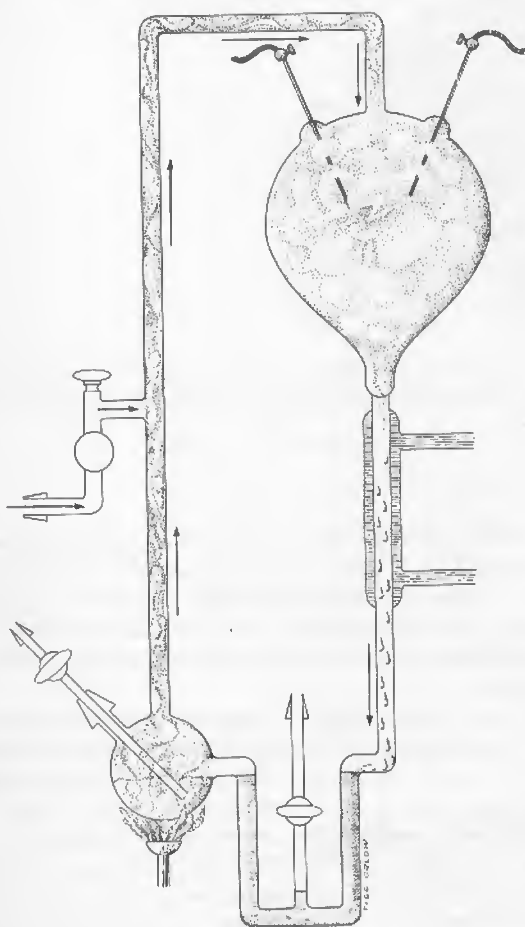


Fig. 1.11 Aparelho criado por Stanley L. Miller para demonstrar a síntese de substâncias orgânicas, sem participação de seres vivos (síntese pré-biótica), nas condições da atmosfera terrestre há cerca de 4 bilhões de anos. O aparelho continha vapor d'água, proveniente do aquecimento do balão inferior. Pela torneira superior esquerda, introduziam-se, na coluna, metano, amônia, hidrogênio e gás carbônico. Ao passar pelo balão superior direito, a mistura era submetida a centelhas elétricas. A mistura tornava-se líquida no condensador e era recolhida pela torneira inferior. Observou-se que esse líquido continha substâncias orgânicas diversas, inclusive aminoácidos.

É provável que, no caldo primordial, tenham surgido polímeros de aminoácidos e de nucleotídeos, formando-se assim as primeiras moléculas de proteínas e de ácidos nucléicos. Todavia, somente ácidos nucléicos são capazes de autoduplicação, e a demonstração experimental recente de que em laboratório moléculas de RNA simples são capazes de evoluir para moléculas mais complexas, sem auxílio de proteínas enzimáticas, faz supor que a evolução começou com moléculas de RNA. Como será visto adiante, no Cap. 3, o RNA pode ter atividade enzimática, propriedade que já se pensou ser exclusiva das proteínas. Aparecidas as primeiras moléculas de RNA com capacidade de se multiplicarem e de evoluir, estava iniciado o caminho para as primeiras células. Porém, era necessário que o sistema autocatalítico ficasse isolado, para que as moléculas não se dispersassem no líquido prebiótico. Provavelmente ao acaso formaram-se moléculas de fosfolipídios que, espontaneamente, constituíram as primeiras bicamadas fosfolipídicas, e estas podem ter envolto conjuntos de moléculas de ácidos ribonucléicos, nucleotídeos, proteínas e outras moléculas. Estava, assim, constituída a primeira célula, com sua membrana fosfolipídica. Os fosfolipídios são moléculas alongadas, com uma cabeça hidrofílica e duas cadeias hidrofóbicas. Quando estão dissolvidas em água, as moléculas de fosfolipídios se prendem por interação hidrofóbica de suas cadeias e constituem bicamadas espontaneamente, sem necessidade de energia (v. Cap. 5).

Os dados hoje disponíveis permitem supor que, em seguida ao ácido ribonucléico (RNA), deve ter surgido o ácido desoxirribonucléico (DNA), formado pela polimerização de nucleotídeos sobre um molde (*template*) de RNA, e os dois tipos de ácidos nucléicos passaram a determinar os tipos de proteínas a serem sintetizadas. Considerando a enorme variedade de proteínas celulares, formadas por 20 monômeros diferentes (os 20 aminoácidos), é pouco provável que todas as proteínas se tenham formado por acaso. A síntese das proteínas deve ter sido dirigida pelos ácidos nucléicos, com eliminação das proteínas inúteis pelo próprio processo evolutivo.

É razoável supor que a primeira célula que surgiu era estruturalmente simples, certamente uma procarionte heterotrófica e, também, que essa célula foi precedida por agregados de RNA, DNA e proteínas, envoltos por bicamada de fosfolipídios. Esses agregados continuaram o processo evolutivo iniciado pelas moléculas de RNA, e deram origem às primeiras células, que devem ter sido procariontes estruturalmente simples.

Como essas primeiras células procariontes eram heterotróficas e, portanto, incapazes de sintetizar compostos ricos em energia (alimentos), o processo evolutivo teria sido interrompido pelo esgotamento dos compostos de carbono formados pelo processo prebiótico, nos nichos onde surgiram as células primordiais. Essas primeiras células, além de procariontes e heterotróficas, eram também anaeróbias, pois não existia oxigênio na atmosfera. Teria sido difícil sustentar o processo evolutivo das células primitivas se elas tivessem permanecido dependentes, para sua nutrição, das moléculas energéticas formadas por síntese prebiótica no caldo primordial.

A manutenção da vida na Terra dependeu, então, do aparecimento das primeiras células autotróficas, ou seja, capazes de

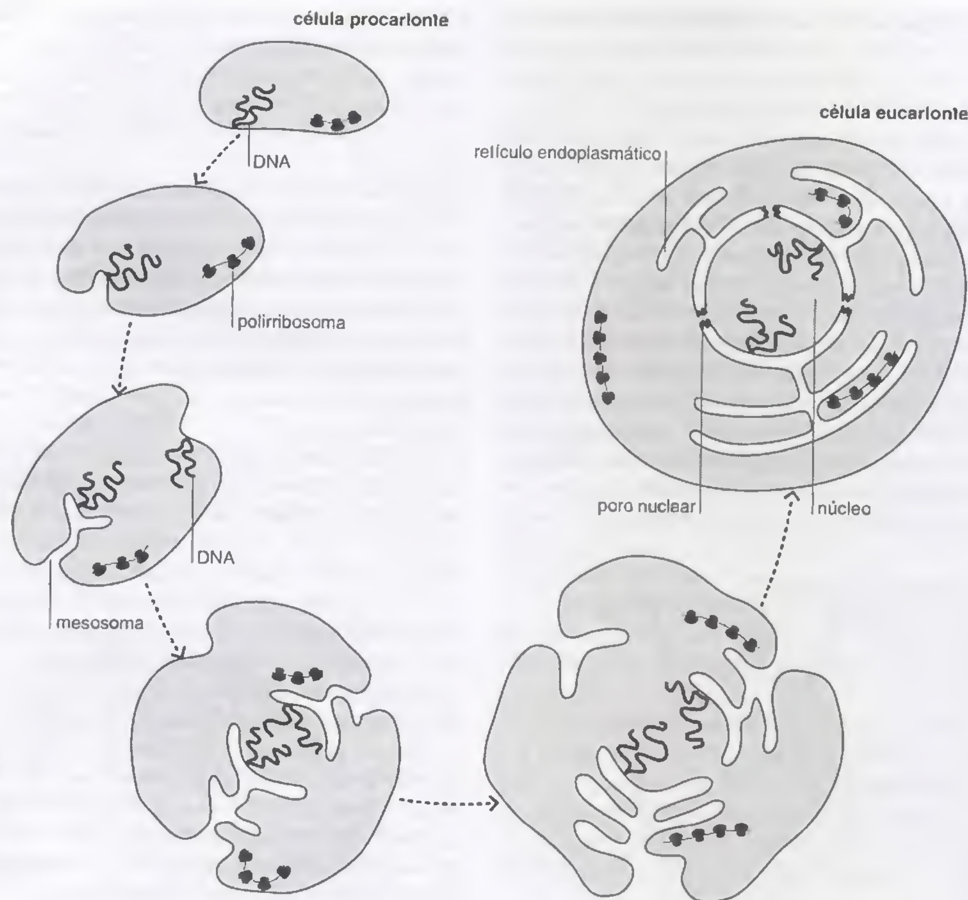


Fig. 1.12 Desenho mostrando como, provavelmente, apareceram os compartimentos intracelulares, por invaginações da membrana plasmática. Essa hipótese é apoiada pela observação de que as membranas intracelulares têm constituição molecular muito semelhante à da membrana plasmática.

sintetizar moléculas complexas a partir de substâncias muito simples e da energia solar. Admite-se que tenha surgido, em células procariontes, um sistema capaz de utilizar a energia do Sol e armazená-la em ligações químicas, sintetizando assim alimentos e liberando oxigênio. Esse novo tipo celular seria provavelmente muito semelhante ou, talvez, igual às algas azuis ou cianofíceas, que são bactérias ainda hoje existentes. Iniciou-se, assim, a fotossíntese, que ocorreu graças ao aparecimento, nas células, de certos pigmentos, dos quais o mais comum é a clorofila (pigmento de cor verde), que capta as radiações azul e vermelha da luz do Sol, utilizando sua energia para ativar processos sintéticos.

O oxigênio liberado pela fotossíntese realizada pelas bactérias autotróficas foi-se acumulando na atmosfera. Isto veio a produzir grandes alterações na atmosfera, pois as moléculas de oxigênio (O_2) foram-se difundindo para as alturas mais elevadas, onde se romperam sob ação da radiação ultravioleta, originando átomos de oxigênio (O), muitos dos quais se recombinaram para formar **ozônio** (O_3), que tem grande capacidade de absorver o ultravioleta. Desse modo, formou-se, pouco a pouco, uma camada de ozônio que protege a superfície da Terra contra a radiação ultravioleta, mas que é transparente aos comprimentos de onda visíveis.

O início da fotossíntese e as modificações da atmosfera foram de grande importância para a evolução das células e das formas de vida hoje existentes na Terra. Graças à fotossíntese surgiu o oxigênio na atmosfera, e isto permitiu o aparecimento de células aeróbias, ao mesmo tempo que criou uma cobertura protetora de ozônio nas camadas superiores da atmosfera. As bactérias anaeróbias ficaram restritas a nichos especiais, onde não existe oxigênio.

Supõe-se que o passo seguinte no processo evolutivo, depois das células procariontes autotróficas, tenha sido o aparecimento das células eucariontes. Tudo indica que as células eucariontes, caracterizadas por seu elaborado sistema de membranas, se tenham originado a partir de procariontes, por invaginações da membrana plasmática, que foi puxada por proteínas contráteis previamente aparecidas no citoplasma (ver adiante, neste capítulo). Essa hipótese é apoiada pela observação de que as membranas intracelulares mantêm aproximadamente a mesma assimetria que existe na membrana plasmática. A face das membranas internas que está em contato com o citosol (matriz citoplasmática) assemelha-se à sua equivalente na membrana plasmática, e o mesmo acontece com a face voltada para o interior dos compartimentos intracelulares, que tem semelhança com a face externa da membrana plasmática (Fig. 1.12).

Há evidências sugestivas de que as organelas envolvidas nas transformações energéticas, cloroplastos e mitocôndrias, derivam de bactérias que foram fagocitadas, escaparam dos mecanismos de digestão intracelular e se estabeleceram como simbiontes nas

células eucariontes hospedeiras, criando um relacionamento mutuamente benéfico e que se tornou irreversível, com o passar dos anos (Fig. 1.13), devido a mutações ocorridas no simbionte. Dentre as numerosas evidências a favor desta hipótese, pode-se citar o fato de que mitocôndrias e cloroplastos possuem DNA cuja cadeia é circular, como nas bactérias. Estas organelas possuem membrana dupla, sendo a membrana interna muito semelhante, em sua composição, às membranas bacterianas, enquanto a membrana externa, que seria a parede do vacúolo fagocítico, assemelha-se à membrana das células eucariontes hospedeiras. Além disso, simbiose entre bactérias e células eucariontes continua acontecendo, sendo inúmeros os casos atualmente existentes (Fig. 1.14).

Ao longo da evolução, tanto as mitocôndrias como os cloroplastos foram perdendo seu genoma para o núcleo da célula hospedeira, e se tornaram dependentes do DNA dos cromosomas das células hospedeiras. A maior parte das proteínas das mitocôndrias e dos cloroplastos são codificadas por RNA mensageiro proveniente do núcleo celular, sintetizadas nos polirribosomas da matriz citoplasmática e, depois, transferidas para dentro das mitocôndrias e cloroplastos.

Como teriam surgido as células eucariontes?

O aparecimento das células eucariontes, durante o lento processo evolutivo, é um aspecto de difícil elucidação, principalmente porque não existem hoje células intermediárias entre procariontes e eucariontes, o que facilitaria a elucidação dessa modificação evolutiva.

Parece claro que, embora as mitocôndrias e os cloroplastos sejam derivados de células procariontes, é difícil imaginar a formação de uma célula eucarionte pela simples união entre duas células procariontes típicas. Uma delas deve ter sofrido modificações evolutivas que não foram conservadas nas células procariontes atuais. É possível que as células eucariontes tenham evoluído gradualmente, na seqüência exposta a seguir (Fig. 1.15).

Uma célula procarionte heterotrófica e anaeróbia, já com o sistema DNA→ RNA→ Proteína funcionando (1), teria perdido a parede celular (2) e aos poucos aumentaria de tamanho e apresentaria invaginações na membrana plasmática. Admite-se que, nessas reentrâncias, se acumularam enzimas digestivas que

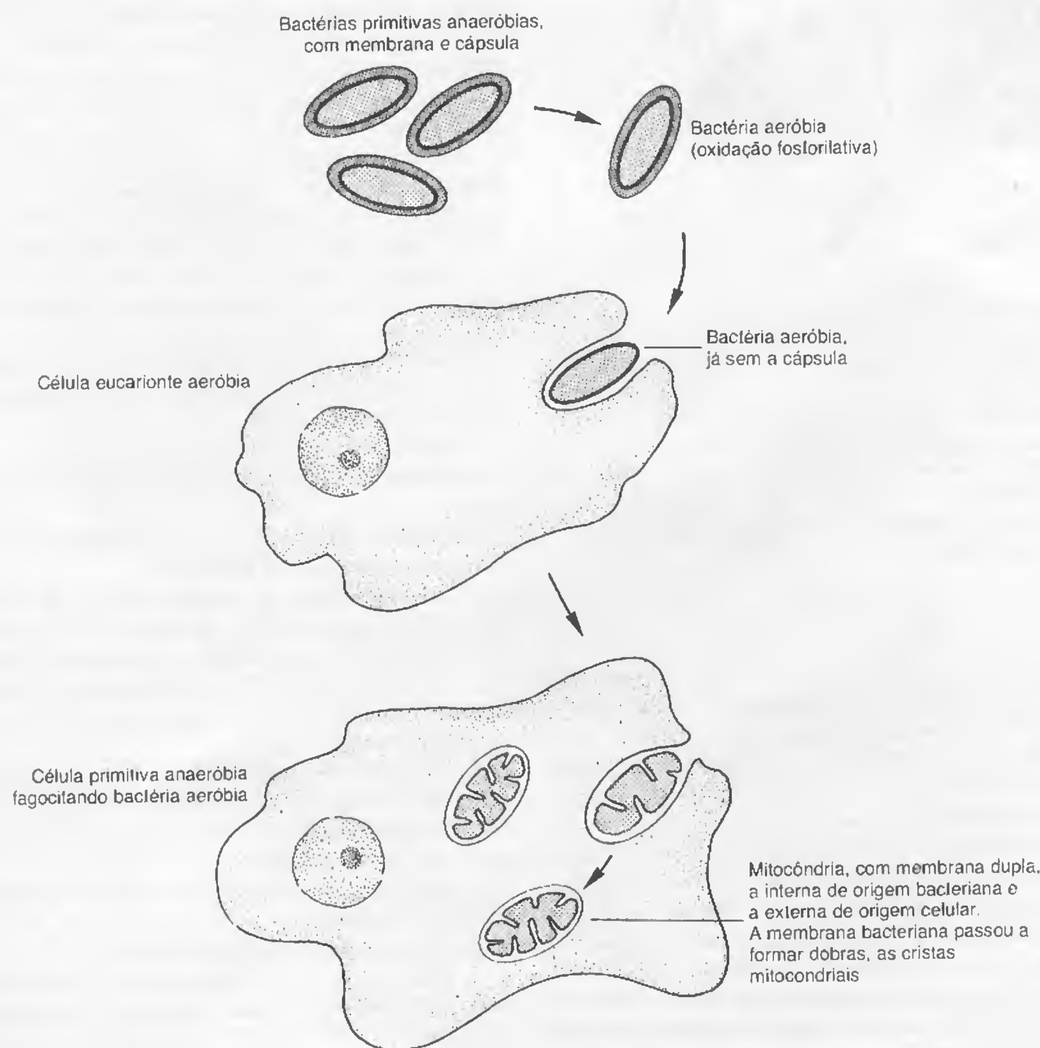


Fig. 1.13 Desenho esquemático mostrando a teoria da origem bacteriana das mitocôndrias. Células eucariontes anaeróbias, primitivas, teriam fagocitado bactérias aeróbias. Estas, de algum modo, escaparam à digestão intracelular e estabeleceram inter-relações mutuamente úteis com as células hospedeiras, que assim se tornaram aeróbias. Ao mesmo tempo, as bactérias, entre outras vantagens, receberam proteção e alimentação em sua nova localização no citoplasma da célula hospedeira.

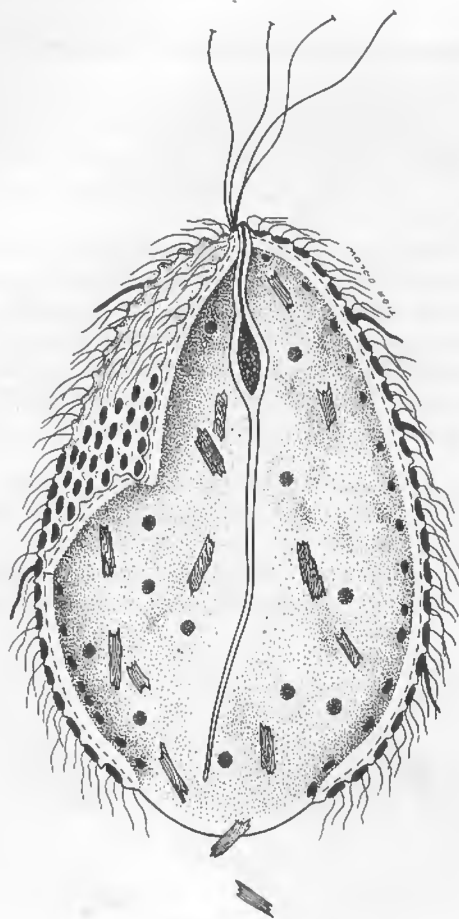


Fig. 1.14 Esta figura mostra que o tipo de simbiose que teria dado origem aos cloroplastos e mitocôndrias existe atualmente e, portanto, poderia ter ocorrido no passado. O desenho mostra o protozoário *Myxotricha paradoxa*, um parasita intestinal dos cupins. Por si próprio, esse protozoário é quase imóvel. Sua mobilidade é devida a milhares de bactérias ciliadas de forma alongada que se inserem na superfície do protozoário. Além destas bactérias móveis simbiontes da superfície, a *Myxotricha* possui outras bactérias simbiontes, tanto na superfície como em seu interior. (Baseado em trabalhos de L. Margulis.)

permitiram uma melhor digestão das partículas de alimentos (3). Então, algumas invaginações se desprenderam da membrana, formando vesículas membranosas que deram origem ao sistema lisosômico, às vesículas precursoras do retículo endoplasmático, e levaram para a parte profunda da célula o DNA que estava preso à membrana plasmática (4). Com o aparecimento de oxigênio na atmosfera, devido às bactérias fotossintéticas, devem ter surgido os peroxisomas (5), defendendo as células contra a ação deletéria de radicais livres contendo oxigênio. Houve um aumento de DNA, paralelo à crescente complexidade celular, e este DNA, constituído de longas fitas, foi concentrado em cromosomas, que foram segregados dentro do núcleo delimitado pelo envoltório nuclear formado a partir de material membranoso vindo da superfície celular. Houve também um desenvolvimento do citoesqueleto, com o aparecimento de microtúbulos e aumento na quantidade de microfilamentos. À medida que a concentração de oxigênio foi lentamente aumentando na atmosfera, as células que incorporaram procariontes aeróbios predominaram, por seleção natural, por duas razões: a respiração aeróbica é muito mais eficiente e, além disso, gasta oxigênio, diminuindo a formação intracelular de radicais livres contendo oxigênio. A **endobiose** (simbiose intracelular) de procariontes aeróbicos deu origem às mitocôndrias (6), organelas com duas membranas, a interna da bactéria precursora e a externa da célula eucarionte que estava em formação. Provavelmente, os cloroplastos originaram-se de maneira semelhante, também por endobiose, porém de bactérias fotossintéticas. Ao longo da evolução, houve transferência da parte do genoma dos cloroplastos e mitocôndrias para os núcleos celulares. Mas os cloroplastos transferiram menos DNA, em comparação com as mitocôndrias. É possível que a endobiose das mitocôndrias tenha ocorrido antes da endobiose que originou os cloroplastos.

Padrões celulares e os grandes grupos de seres vivos

O sistema mais antigo de classificação dos seres vivos considera a existência de apenas dois reinos — o animal e o vegetal. No primeiro estavam incluídos os heterótrofos, que se alimentam por ingestão, exceto os parasitas, que se nutrem por osmose. No reino vegetal estavam incluídos os organismos fotossintetizantes, com adição das bactérias, mixomicetos e fungos.

Em virtude dos inconvenientes da divisão dos seres vivos em dois reinos, foram criadas recentemente outras divisões, mais condizentes com o estágio atual dos conhecimentos. Um dos sistemas atuais, muito usado, admite 5 reinos (Fig. 1.16):

Monera. Formado pelas bactérias, que são os únicos seres procariontes (as cianofíceas, ou algas azuis, também são bactérias).

Protista. Que compreende organismos eucariontes primariamente unicelulares de vida livre ou unicelulares coloniais (protozoários e fitoflagelados).

Fungi. Compreendendo todos os fungos.

Plantae. Que inclui as algas clorofíceas e os vegetais superiores.

Animalia. Incluindo todos os animais, isto é, os seres que passam pelo estágio de gástrula.

O conceito atual de protista não é o mesmo proposto por Haeckel no passado. Hoje incluem-se no reino protista apenas os protozoários e os organismos limítrofes, como os fitoflagelados, que sempre foram objeto de disputa, pois eram incluídos por uns entre os animais e por outros entre os vegetais, na antiga classificação em dois reinos.

Os fungos foram removidos do conceito antigo de plantas e colocados à parte. Eles possivelmente derivam de ancestrais que deram origem a animais e não a vegetais. É oportuno citar algumas características dos fungos:

1. Não possuem clorofila nem quaisquer outros pigmentos fotossintetizantes.
2. Não formam tecidos verdadeiros.
3. Não possuem parede de celulose (característica dos vegetais), mas fundamentalmente composta de quitina (característica dos animais).
4. Não armazenam amido (reserva nutritiva dos vegetais) como reserva energética, mas sim glicogênio (reserva nutritiva dos animais).
5. O fuso da divisão mitótica forma-se no interior do envoltório nuclear.

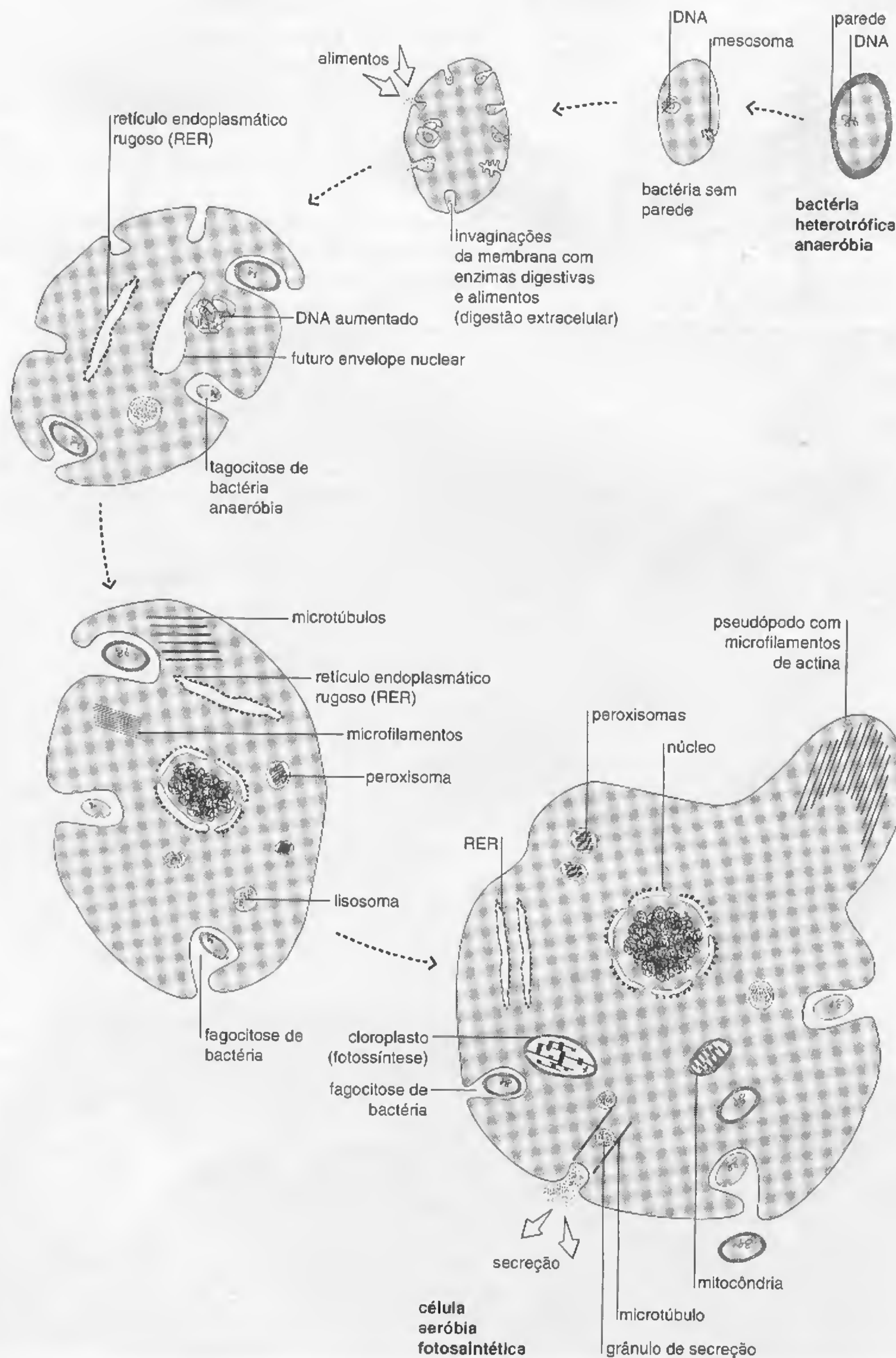


Fig. 1.15 Desenho, baseado principalmente nos trabalhos de C. De Duve, mostrando a maneira como, provavelmente, se constituíram as primeiras células eucariontes, no longo processo evolutivo que precedeu o aparecimento dos seres pluricelulares. Para explicações, ver no texto o subtítulo ***Como teriam surgido as células eucariontes?***

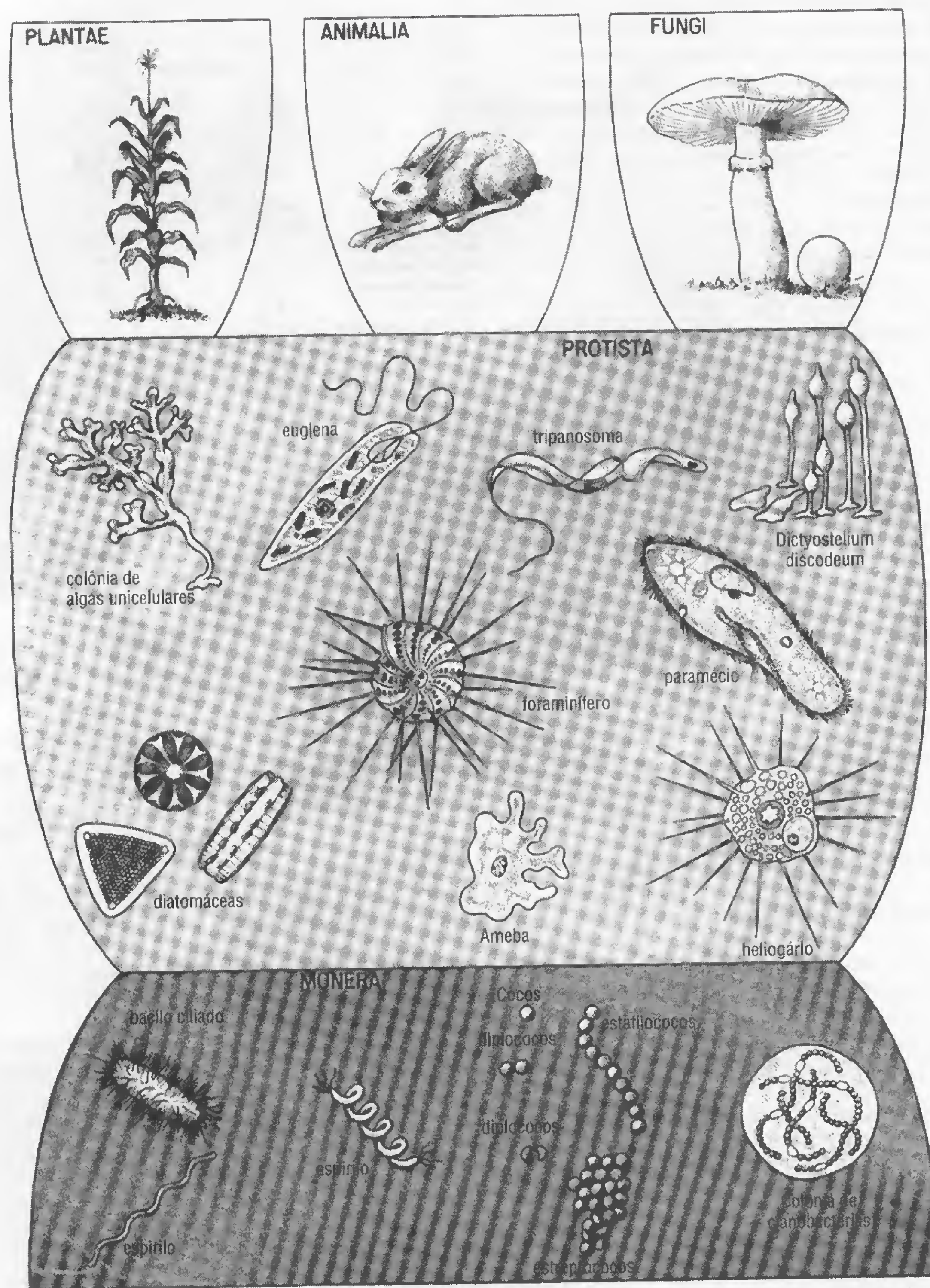


Fig. 1.16 Esquema dos cinco reinos a que pertencem os seres vivos. O reino Monera, único cujas células são procariontes, é constituído pelas bactérias (incluindo as cianofíceas ou "algas azuis"). Nos demais reinos, todas as células são eucariontes. O reino Protista é composto de formas unicelulares ou unicelulares coloniais. O reino Fungi compreende os fungos. O reino Plantae inclui os vegetais superiores. No reino Animalia estão todos os animais.

Sumário

Os vírus são formados de uma parte central com a informação genética codificada seja em DNA ou em RNA, mas nunca os dois ácidos nucléicos estão presentes no mesmo vírus. Esse genoma é protegido por uma estrutura que o envolve, constituída por unidades protéicas denominadas capsômeros. *Alguns vírus apresentam um invólucro lipoprotéico, contendo lipídios da célula parasitada e proteínas virais. Os vírus só se multiplicam no interior das células, cuja maquinaria utilizam para a síntese de novos vírus.*

Apesar da grande diversidade entre os seres vivos em geral, todos constituídos por células, existem apenas dois tipos celulares básicos: as células procariontes *e as* eucariontes. *As primeiras são encontradas nas bactérias; as segundas constituem os demais seres vivos.*

As células procariontes *são menores e caracterizam-se pela falta de um sistema de membranas que divida a célula em compartimentos funcionais. Seu material genético consiste em um filamento duplo de DNA, de forma circular, localizado num espaço citoplasmático onde a matriz é menos elétron-densa: o* nucleóide. *Nestas células existe apenas a membrana plasmática, que pode apresentar dobras dirigidas para dentro das células: os* mesosomas. *Nas células procariontes fotossintéticas aparecem algumas membranas citoplasmáticas que, associadas à clorofila, são responsáveis pela fotossíntese nessas células. As células procariontes não têm citoesqueleto e são de forma simples. Nestas células, a forma é mantida pela presença de uma* parede extracelular *rígida que serve também de proteção.*

As células eucariontes *apresentam-se divididas em* compartimentos funcionais *graças à presença de um sistema complexo de membranas que cria microrregiões intracelulares especializadas, onde certas funções podem ser executadas com mais eficiência. Além desse papel de compartimentação, o sistema de membranas cria uma enorme superfície à qual se prendem, em seqüência predeterminada, moléculas enzimáticas e transportadoras. Assim, os substratos são processados pelos componentes das cadeias enzimáticas sem que haja necessidade de grandes deslocamentos, que diminuiriam acentuadamente a rapidez e o rendimento dos processos metabólicos.*

Dentre os principais compartimentos das células eucariontes estão o núcleo, *o* **envoltório nuclear**, *o* retículo endoplasmático (liso e rugoso), *o* aparelho de Golgi, *os* lisosomas, *as* mitocôndrias *e, nas células vegetais, os* cloroplastos. *Outra característica das células eucariontes é possuir* citoesqueleto fibrilar, *responsável pelos movimentos celulares e pela manutenção da forma — muitas vezes altamente complexa — dessas células. O citoesqueleto é constituído de* microtúbulos (*cerca de 24 nm de diâmetro*), filamentos intermediários *(cerca de 10 nm de diâmetro) e* microfilamentos de actina *(cerca de 6 nm de diâmetro).*

Bibliografia

ALBERTS, B. *et al. Molecular Biology of the Cell.* Garland Press, 3rd ed., 1994.

BARGHOORN, E.S. The oldest fossils. *Sci. Am., 224*(5):30, 1971.

BERKALOFF, A. *et al. Bilogie et Physiologie Cellulaires.* 2ème ed., 4 vols., Hermann, 1981.

BERSHADSKY, A.D. and VASILIEV, J.M. *Cytoskeleton.* Plenum Press, 1988.

BRINKLEY, B.R. Microtubule organizing centers. *Ann. Rev. Cell Biol., 1*:145, 1985.

CECH, T.R. RNA as an enzyme. *Sci. Am., 255*(5):64, 1986.

COHEN, C. Protein assemblies and cell form. *Trends in Biochem. Sci.,* 2:51,1978.

DARNELL, J.E., LODISH, H.F. and BALTIMORE, D. *Molecular Cell Biology.* 2nd. ed. W.H. Freeman, 1990.

DE BRABANDER (ed.) *Microtubules and Microtubule Inhibitors.* Elsevier, 1980.

DE DUVE, C. *A Guided Tour of the Living Cell.* 2 vols., Freeman, 1985.

DE DUVE, C. *Blueprint for a Cell; The Nature and Origin of Life.* Neil Patterson Pub., 1991.

DE DUVE, C. The birth of complex cells. *Sci. Am. 274(4):38, 1996.*

DUSTIN, P. *Microtubules.* 2nd. ed., Springer-Verlag, 1984.

FAHIMI, H.D. and SIES, H. (eds.) *Peroxisomes in Biology and Medicine* Springer-Verlag, 1987.

FAWCETT, D.W. *The Cell.* 2nd. ed., Saunders, 1981.

FIELD, K.G. *et al.* Molecular phylogeny of the animal kingdom. *Science, 239*:748, 1988.

FUCHS, E. and HANUKOGLU, I. Unraveling the structure of the intermediate filaments. *Cell, 34*:332, 1983.

GOODMAN, S.R. *Medical Cell Biology.* Lippincott, 1994.

GOULD, S.J. KELLER, G.A. and SUBRAMANI, S. Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of tour peroxisomal proteins *J. Cell Biol., 107*:897, 1988.

GRAY, M.W. The evolutionary origins of organelles. *Trends Genetics 5*:294, 1989.

KARP, G. *Cell and Molecular Biology; Concepts and Experiments.* John Wiley, 1996.

LAZAROW, P.B. and FUJIKI, Y. Biogenesis of peroxisomes. *Ann. Rev. Cell Biol., 1*:489, 1985.

LAZAROW, P.B. Genetic approaches to studying peroxisome biogenesis. *Trends Biochem. Sci. 3*:89, 1993.

MARGULIS, L. Symbiosis and evolution. *Sci. Am., 225*:48, 1971.

MARGULIS, L. *Symbiosis in Cell Evolution.* Freeman, 1981.

PORTER, K.R. and TUCKER, J.B. The ground substance of the living cell. *Sci. Am., 244*(3):56, 1981.

SUBRAMANI, S. Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Ann. Rev. Cell Biol. 9*:445, 1993.

VALE, R.D. Intracellular transport using microtubule-based motors. *Ann. Rev. Cell Biol., 3*:347, 1987.

VIDAL, G. The oldest eukaryotic cells. *Sci. Am., 250*(2):48, 1984.

WEBER, K. and OSBORN, M. The molecules of the cell matrix. *Sci. Am., 253*(10):110, 1985.

WOLFE, S.L. *Molecular and Cellular Biology.* Wadsworth, 1993.

2 Tecnologia da Biologia Celular e Molecular: Alguns Exemplos

Roteiro

- *Por estudar objetos muito pequenos, as células e moléculas, a biologia celular e molecular é muito dependente do aperfeiçoamento dos aparelhos e técnicas de pesquisa.*
- *Para estudo no microscópio óptico, os tecidos são fixados, cortados e corados.*
- *Os microscópios de contraste de fase facilitam o exame de células vivas.*
- *Com o microscópio confocal, é possível fazer cortes ópticos da célula e a reconstituição tridimensional, por computação, de organelas e outros constituintes celulares.*
- *O microscópio eletrônico de transmissão tem alta resolução e desvendou novas minúcias da estrutura celular.*
- *O microscópio eletrônico de varredura visa ao estudo das superfícies externas e internas das células e organelas.*
- *A imunocitoquímica é empregada para a localização de macromoléculas celulares específicas.*
- *As culturas mantêm as células vivas e proliferando por muito tempo, facilitando o estudo de suas funções.*
- *As organelas podem ser isoladas das células por centrifugação fracionada.*
- *A cromatografia em coluna é utilizada para separar macromoléculas celulares.*
- *A eletroforese é uma técnica que pode ser usada para identificar macromoléculas e para determinar o tamanho das moléculas protéicas.*

Os conhecimentos sobre as células progridem paralelamente ao aperfeiçoamento dos métodos de investigação. Inicialmente, o microscópio óptico possibilitou o descobrimento das células e a elaboração da teoria de que todos os seres vivos são constituídos por células.

Posteriormente, foram descobertas técnicas citoquímicas que possibilitaram a identificação e localização de diversas moléculas constituintes das células. Com o advento dos microscópios eletrônicos, que têm grande poder de resolução, foram observados pormenores da estrutura celular que não poderiam sequer ser imaginados pelos estudos feitos com os microscópios ópticos.

Mais ou menos simultaneamente com o uso dos microscópios eletrônicos, foram aperfeiçoados métodos para a separação de organelas celulares e para o estudo *in vitro* de suas moléculas e respectivas funções. A análise de organelas isoladas em grande quantidade, a cultura de células, a possibilidade de manipular o genoma através da adição ou supressão de genes e o aparecimento de numerosas técnicas de uso comum aos diversos ramos da pesquisa biológica levaram ao surgimento do que se costuma chamar de biologia celular e molecular, que é o estudo integrado das células, através de **todo o arsenal técnico disponível**. É impossível descrever, mesmo sumariamente, todas as técnicas utilizadas nos variados estudos sobre as células. Cada pesquisador tem usado sua imaginação para criar abordagens as mais variadas, de acordo com o problema a ser resolvido. Neste capítulo, apenas como exemplos, serão estudadas algumas técnicas que têm contribuído de modo significativo para o progresso da biologia celular e molecular. Para manter o livro com um tamanho razoável, muitas técnicas importantes foram deixadas de lado.

Confecção de cortes para estudo nos microscópios óptico e eletrônico

Embora seja possível o estudo microscópico de células vivas, muitas vezes há vantagem em obter um preparado permanente (lâmina) no qual as células ficam preservadas, isto é, **fixadas** e **coradas**, para melhor demonstração dos seus componentes.

Um preparado permanente ideal deveria mostrar as células com a mesma estrutura microscópica e composição química que possuíam quando vivas. Isto, entretanto, não é possível, e todos os preparados apresentam **artefatos**, que são alterações produzidas nas células pelas técnicas utilizadas.

Fixação. A fixação é a primeira etapa para a obtenção de um preparado permanente, e tem as seguintes finalidades:

1. evitar a **autólise**, que é a destruição da célula por suas próprias enzimas;

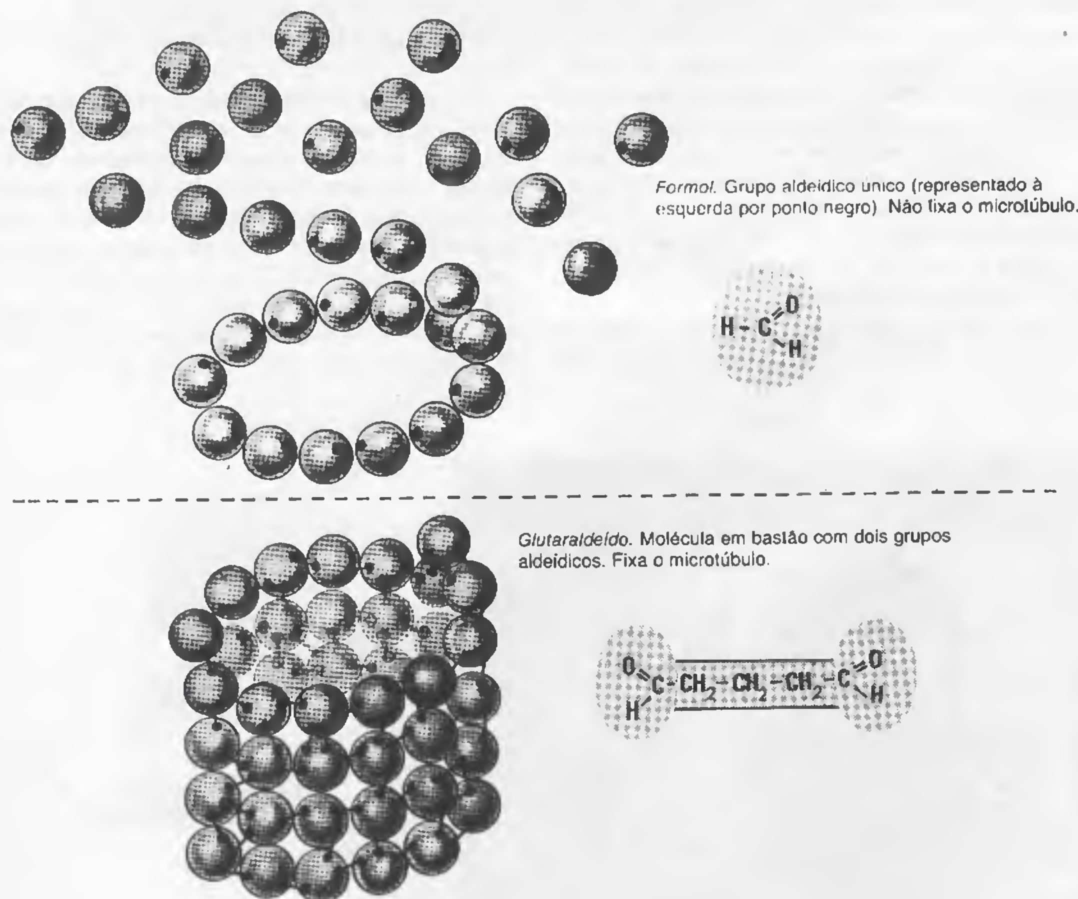


Fig. 2.1 Comparação da atividade fixadora do formol e do glutaraldeído (aldeído glutárico) sobre os microtúbulos, que são constituídos por dímeros protéicos (representados por esferas). Possuindo dois grupamentos aldeídicos, cada molécula do glutaraldeído pode ligar-se a dois dímeros protéicos, mantendo a estrutura do microtúbulo. O formol é incapaz de manter esta estrutura, pois cada molécula de formol tem apenas um grupamento aldeído e se prende a um único dímero.

2. impedir a atividade e a proliferação de bactérias;
3. endurecer as células para que elas resistam melhor às etapas seguintes da técnica;
4. aumentar a afinidade das estruturas celulares pelos corantes usados na microscopia óptica e aumentar o contraste na microscopia eletrônica (ver adiante, neste capítulo).

A química da fixação é complexa e pouco conhecida. O formol e o aldeído glutárico (glutaraldeído) fixam as células por se combinarem com os grupamentos amínicos das proteínas. O aldeído glutárico possui dois grupamentos aldeídicos, um em cada extremidade de sua molécula, sendo capaz de estabelecer pontes entre as unidades protéicas cuja associação constitui a estrutura quaternária da proteína (Fig. 2.1).

O tetróxido de ósmio e o glutaraldeído são os fixadores mais usados em microscopia eletrônica porque coagulam as proteínas, causando modificações mínimas na estrutura celular.

Cada um dos fixadores simples apresenta certos inconvenientes, ao lado de algumas qualidades desejáveis. Por isso foram elaboradas as **misturas fixadoras**, que contêm proporções variáveis dos fixadores simples com a finalidade de compensar-lhes as deficiências.

Microtomia. Em sua maioria, as células fazem parte de tecidos que precisam ser cortados em fatias finas para exame no microscópio. Estes cortes são feitos em um aparelho denominado **micrótomo** (Fig. 2.2). Para ser cortado no micrótomo, o fragmento de tecido fixado é geralmente protegido por um material que o envolve e nele penetra, e que deve possuir propriedades físicas que facilitem o corte. Os tecidos destinados ao estudo no microscópio óptico são protegidos, isto é, **incluídos** em parafina ou em resinas plásticas especiais, e cortados com uma espessura de 1 a 6 μm, geralmente. Para estudo no microscópio eletrônico, os tecidos devem ser incluídos em resinas mais duras, como as do tipo epóxi (Araldite, Epon). Os cortes para o microscópio eletrônico são muito finos, medindo 0,02 a 0,1 μm. Os micrótomos que cortam tecidos incluídos em parafina utilizam navalhas de aço, e os que cortam tecidos incluídos em resinas usam navalhas de vidro ou de diamante.

Coloração. Quase todas as organelas e inclusões são transparentes e incolores, o que dificulta seu estudo microscópico. Para vencer esta dificuldade, foram criados numerosos processos de coloração que tornam visíveis os diversos componentes celulares.

A maioria dos corantes comporta-se como base ou como ácido. Nos **corantes básicos**, o grupamento químico responsável pela cor ou **grupamento cromóforo** (*cromo*, cor, e *foro*, conduzo) é catiônico. Os cromóforos destes corantes combinam-se com os grupamentos ácidos (aniônicos) das moléculas celulares. Portanto, as moléculas ácidas, como as do DNA e RNA, são **basófilas**, isto é, têm afinidade pelos corantes básicos. O azul-de-toluidina e o azul-de-metileno são exemplos de corantes básicos. A hematoxilina, um corante muito usado, comporta-se como corante básico, ligando-se às estruturas basófilas dos tecidos.

Nos **corantes ácidos**, o cromóforo é aniônico (portanto, com carga elétrica negativa) e tende a se combinar com os componentes celulares básicos, que são eletricamente positivos. Estruturas ricas em grupamentos básicos são **acidófilas**, por terem afinidade pelos corantes ácidos. Os corantes ácidos, como a eosina, orange G e fucsina ácida, coram principalmente os componentes básicos das proteínas citoplasmáticas.

O microscópio óptico

O microscópio óptico compõe-se de uma **parte mecânica**, que serve de suporte, e uma **parte óptica**, constituída por três sistemas de lentes: o **condensador**, a **objetiva** e a **ocular** (Fig. 2.3).

A finalidade do condensador é projetar um cone de luz sobre as células que estão sendo examinadas no microscópio. Após atravessar as células, esse feixe luminoso, em forma de cone, penetra na objetiva. A objetiva projeta uma imagem aumentada, no plano focal da ocular, que novamente a amplia. Por fim, a imagem fornecida pela ocular pode ser percebida pela retina como uma imagem situada a 25 cm da lente ocular (Fig. 2.4), ou então pode ser projetada sobre uma tela ou uma chapa fotográfica. A ampliação total dada por um microscópio é igual ao aumento da objetiva multiplicado pelo aumento da ocular.

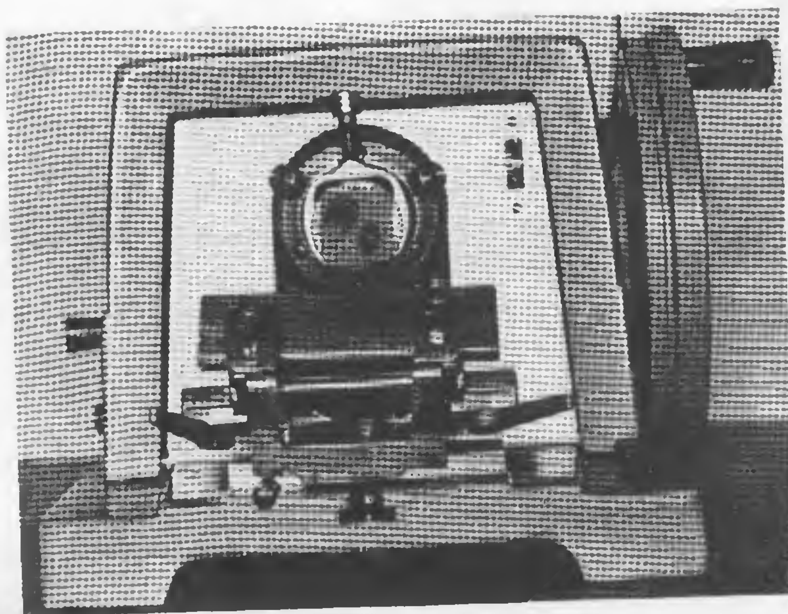


Fig. 2.2 Micrótomo para cortes de tecidos incluídos em parafina. Observar a navalha de aço e o bloco de parafina contendo dois fragmentos de órgãos.

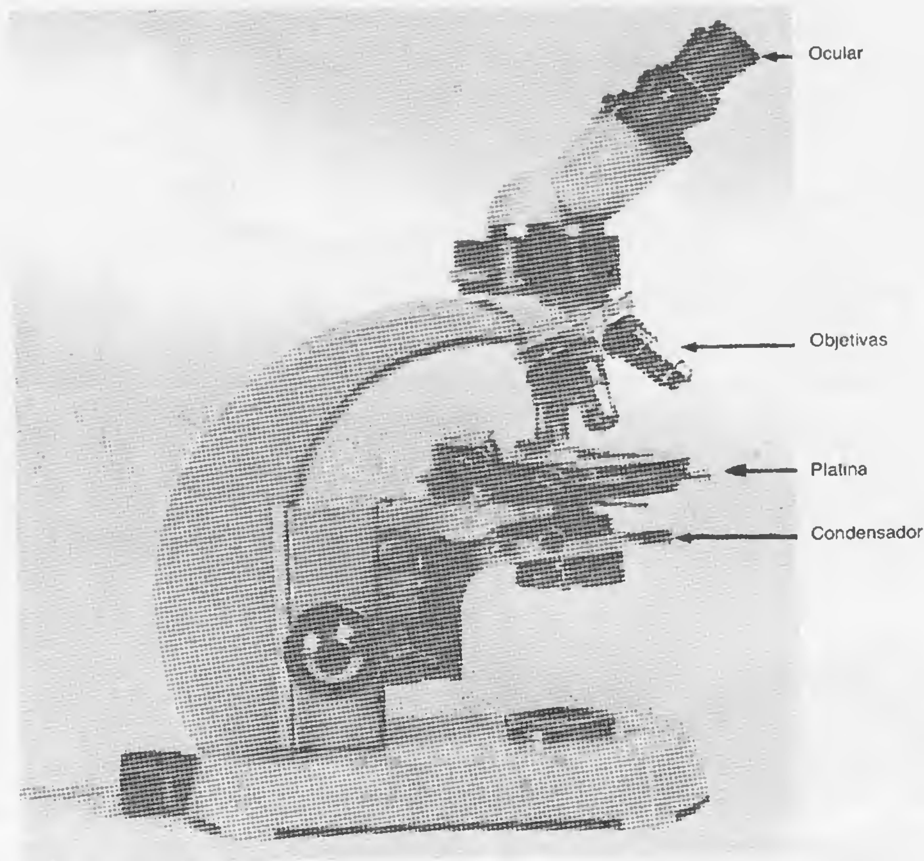


Fig. 2.3 Microscópio óptico moderno, modelo de pesquisa, com iluminação embutida. (Fotografia gentilmente cedida pelo fabricante, Carl Zeiss.)

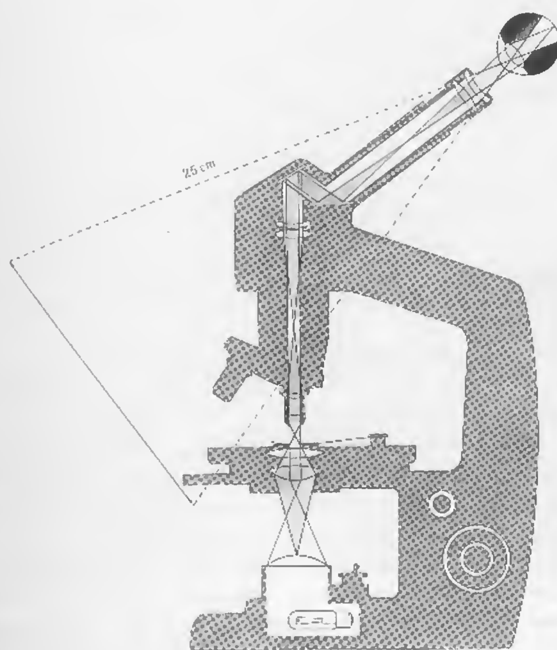


Fig. 2.4 Esquema do microscópio óptico mostrando o trajeto dos raios luminosos.

Chama-se **poder de resolução** de um sistema óptico a sua capacidade de separar detalhes. Na prática, o poder de resolução é expresso pelo **limite de resolução** (Fig. 2.5), que é a menor distância que deve existir entre dois pontos para que eles apareçam individualizados. Por exemplo: duas partículas separadas por 0,3 μm aparecem individualizadas quando examinadas em um sistema óptico com limite resolutivo de 0,2 μm, porém aparecem como uma partícula única quando o limite resolutivo é de 0,5 μm.

O que determina, pois, a riqueza de detalhes da imagem fornecida por um sistema óptico é o seu limite de resolução, e não o seu poder de aumentar o tamanho dos objetos. A propriedade de aumentar só tem valor prático se acompanhada de um aumento paralelo do poder resolutivo. O limite de resolução depende essencialmente da objetiva. A ocular não pode acrescentar detalhes à imagem; sua função é apenas aumentar de tamanho a imagem, que é projetada em seu plano de foco pela objetiva.

O limite de resolução depende, sobretudo, da **abertura numérica** (AN) da objetiva (Fig. 2.6) e do comprimento de onda da luz utilizada.

O limite de resolução (LR) da objetiva é dado pela fórmula

$$LR = \frac{k \times \lambda}{AN}$$

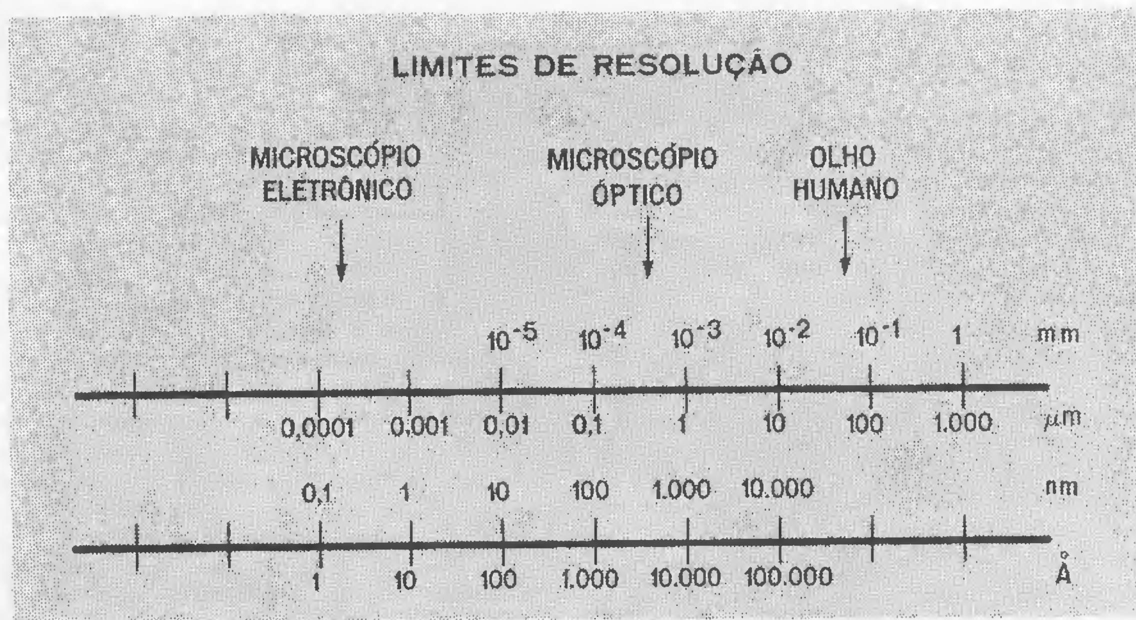


Fig. 2.5 As principais unidades de medida usadas em biologia celular são o micrômetro (µm) e o nanômetro (nm). A unidade ângström (Å) deve ser substituída pelo nanômetro. O quadro acima mostra a equivalência entre essas unidades, comparando-as também com o milímetro (mm). As setas indicam os limites (aproximados) de resolução do olho humano, do microscópio óptico e do microscópio eletrônico.

onde k é uma constante estimada por alguns em 0,61 e, por outros, em 0,5, e λ é o comprimento de onda da luz empregada. Na prática, o objeto é iluminado por luz branca, constituída por diversos comprimentos de onda. Para o cálculo do limite de resolução, toma-se o comprimento de onda da faixa do verde-amarelo (0,55 µm), por ser o olho humano mais sensível a estas cores do que a quaisquer outras. Portanto, na prática

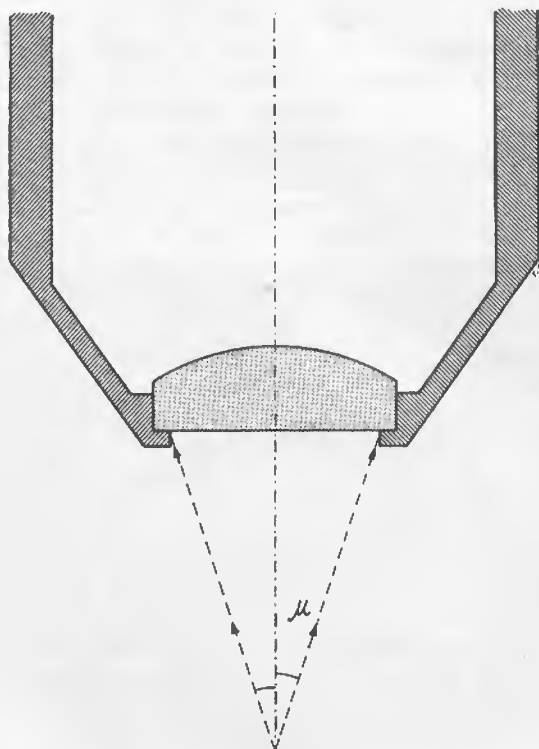


Fig. 2.6 Esquema do cone luminoso que penetra em uma objetiva, mostrando o semi-ângulo de abertura, que entra no cálculo da abertura numérica (AN).

$$LR = \frac{0{,}61 \times 0{,}55}{AN}$$

A análise desta fórmula mostra que o limite de resolução é diretamente proporcional ao comprimento de onda da luz usada e inversamente proporcional à abertura numérica da objetiva.

Microscópio de polarização. O emprego de um feixe luminoso polarizado permite estudar certos aspectos da organização molecular dos constituintes celulares. Ao atravessar a célula, o feixe de luz pode passar por estruturas cristalinas ou constituídas por moléculas alongadas e paralelas, que dividem o feixe polarizado em dois, cujos planos são perpendiculares. Estas estruturas são chamadas **anisotrópicas** e são **birrefringentes**, pois apresentam dois índices de refração diferentes, conforme a incidência da luz. As estruturas celulares que não apresentam tal organização não modificam o plano de polarização da luz, e são ditas **isotrópicas**.

O microscópio de polarização é semelhante ao microscópio óptico comum, acrescido de dois prismas ou dois discos polaróides. Um destes elementos é colocado no condensador e funciona como **polarizador**; o outro é colocado na ocular e é chamado **analisador.** A função do polarizador é iluminar a célula com um feixe de luz polarizada. O analisador verifica o efeito das estruturas celulares sobre o feixe polarizado.

Quando o polarizador e o analisador estão com seus planos de polarização perpendiculares (cruzados), só as estruturas birrefringentes ou anisotrópicas podem ser vistas. Isto ocorre porque elas dividem o feixe polarizado em dois; um deles é absorvido pelo analisador, mas o outro, perpendicular ao primeiro, atravessa o analisador e vai formar a imagem. As estruturas

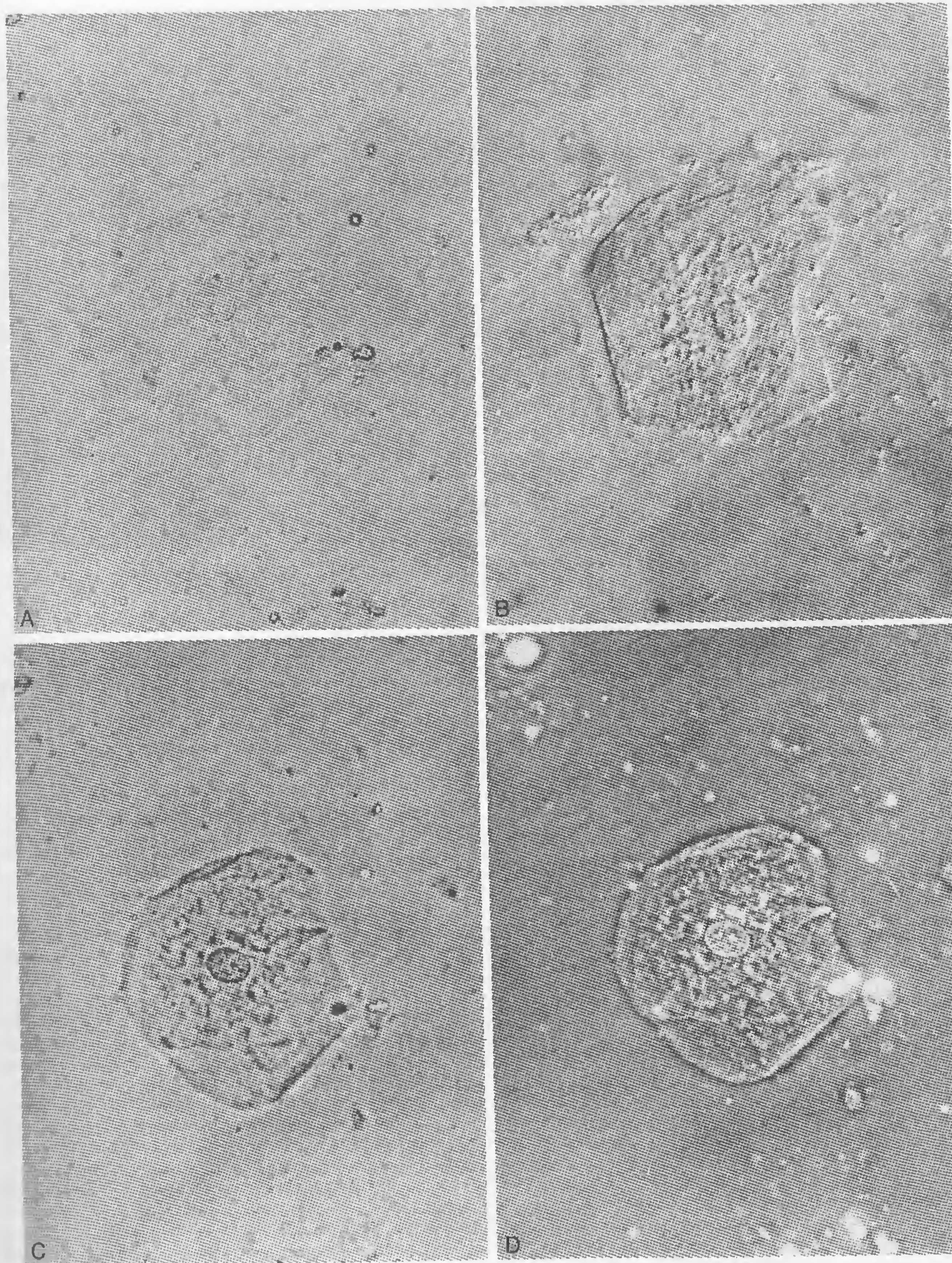


Fig. 2.7 Comparação entre a microscopia comum e três tipos de microscopia de interferência (contraste de fase) na observação de uma célula epitelial sem coloração. **A.** Microscópio comum. **B.** Microscopia interferencial segundo Normasky. **C.** Microscópio de contraste de fase, com fase positiva. **D.** Microscopia de contraste de fase, com fase negativa. (As fotomicrografias foram gentilmente cedidas pelo Prof. Raul Machado.)

isotrópicas não são vistas, pois não desviam o plano de polarização da luz, e o feixe que passa pelo polarizador chega inalterado ao analisador, onde é retido.

Microscópio de contraste de fase. Este microscópio é dotado de um sistema óptico especial que transforma diferenças de fase dos raios luminosos em diferenças de intensidade. Assim, as diferenças de fase, para as quais o olho não é sensível, tornam-se visíveis, pois são traduzidas em diferenças de intensidade luminosa, facilmente perceptíveis (Fig. 2.7). O microscópio de contraste de fase pode ser usado de modo que as estruturas celulares apareçam escuras (fase positiva) ou claras (fase negativa). Comparar as Figs. 2.7**C** e **D**.

A velocidade da luz ao atravessar um corpo e o índice de refração deste dependem da quantidade de matéria presente, isto é, da densidade do corpo. Quanto maior a densidade, menor será a velocidade da luz no interior deste corpo. Menor será também o índice de refração.

As diversas estruturas celulares têm quantidades diversas de matéria e causam atrasos diferentes na luz que as atravessa. Isto gera diferenças de fase na luz emergente, que, por interferência, são transformadas em diferenças de amplitude, dando diferenças de intensidade luminosa, às quais a retina é sensível.

O microscópio de contraste de fase é empregado em especial para o estudo de células vivas. É de grande utilidade para a observação de células cultivadas, cujo crescimento e divisão mitótica podem ser facilmente seguidos sem o emprego de corantes.

O microscópio idealizado por Normaski é um tipo de microscópio de contraste de fase que se utiliza da luz polarizada. Como no microscópio de fase comum, as estruturas celulares se tornam visíveis devido à interferência dos raios luminosos emergentes (Fig. 2.7**B**).

Microscópio confocal. Células isoladas e cortes de tecidos têm espessura maior do que o plano de foco do microscópio óptico. Na prática, as lâminas são examinadas usando-se o artifício de variar o plano de focalização através do botão micrométrico do microscópio, o que modifica a distância entre as células e a lente objetiva. Com a movimentação do botão micrométrico, um plano da célula entra em foco, enquanto os outros planos saem de foco. Todavia, esse procedimento tem o inconveniente de oferecer uma imagem do plano focalizado que perde nitidez pela interferência dos raios luminosos passando pelos planos que estão fora de foco. Na realidade, forma-se uma imagem nítida do plano focalizado e, simultaneamente, a ela está superposta a imagem "borrada" dos outros planos da célula. O **microscópio confocal** (Fig. 2.8) soluciona esse inconveniente do microscópio óptico comum. No microscópio confocal, a iluminação é feita por um delgado feixe de raios laser, que varre o corte iluminando apenas, ponto por ponto, um determinado plano da célula, realizando um verdadeiro "corte óptico". A imagem é formada exclusivamente pelas estruturas que estão no plano da varredura, sem que os componentes celulares situados em outros planos contribuam para a formação da imagem. Não somente a imagem é muito nítida, como também a célula pode ser "cortada" durante a microscopia, e as "fatias" obtidas podem ser utilizadas de várias maneiras. Geralmente, as células são submetidas a um composto fluorescente e a luz emitida é processada num computador, que envia os sinais para formação da imagem na tela de um monitor de vídeo. As imagens dos "cortes ópticos" assim obtidas podem ser armazenadas no disco do computador e utilizadas para construir uma imagem tridimensional, ou para cálculos de comprimento, área, volume e outras análises, de acordo com a finalidade do estudo. Uma vez digitalizadas, as imagens podem ser arquivadas para estudos posteriores.



Fig. 2.8 Microscópio confocal Zeiss. (Reproduzido por cortesia do fabricante.)

O microscópio eletrônico possibilitou a visualização de estruturas celulares não visíveis no microscópio óptico, porque seu poder resolutivo é muito maior

A capacidade resolutiva de qualquer microscópio é limitada pelo comprimento de onda da radiação empregada. A radiação visível permite distinguir detalhes de 0,2 μm, porém a forma de objetos menores não é visível.

Mais recentemente foi aperfeiçoado o microscópio eletrônico (Fig. 2.9). Esse microscópio emprega feixes de elétrons que, acelerados por uma diferença de potencial de 60.000 volts, têm um comprimento de onda de 0,005 nm. No momento não se consegue aproveitar inteiramente a capacidade resolutiva dos melhores microscópios eletrônicos por causa das dificuldades em preservar as células e, sobretudo, em obter cortes extremamente finos, imprescindíveis para o máximo de resolução.

Os componentes do microscópio eletrônico, representados de modo esquemático, lembram um microscópio óptico (Fig. 2.10). Os elétrons são produzidos graças ao aquecimento, no vácuo, de um filamento de tungstênio — o cátodo — que emite elétrons. Estas partículas são aceleradas devido a uma diferença de potencial de 60 a 100 kV existente entre o cátodo e o ânodo. Este último é uma placa perfurada no centro e só permite a passagem de parte dos elétrons, formando um feixe. Os elétrons passam por uma bobina ou **lente magnética**, também chamada conden-

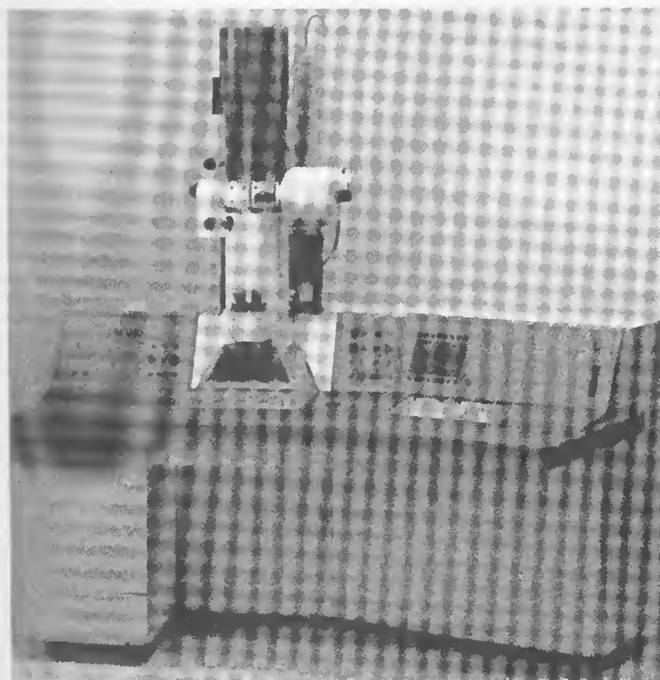


Fig. 2.9 Microscópio eletrônico, modelo EM910 da firma Carl Zeiss. (Cortesia do fabricante.)

sadora, que os dirige em feixe uniforme na direção do objeto. Após atravessar o objeto, onde muitos elétrons são desviados, o feixe passa por outra bobina, que corresponde à objetiva do microscópio óptico. Por fim, uma terceira bobina projeta os elétrons sobre uma tela fluorescente — onde eles formam uma imagem visível — ou sobre um filme fotográfico.

Os elétrons desviados por certas estruturas da célula em estudo não contribuirão para formar a imagem. Essas estruturas aparecem escuras e são chamadas elétron-densas. Os componentes celulares que desviam uma pequena percentagem de elétrons aparecerão em diversas tonalidades de cinza.

A tela fluorescente em que a imagem se forma é uma placa revestida por ZnS (sulfeto de zinco), substância que emite luz ao ser excitada pelos elétrons. Na prática, as observações mais cuidadosas são efetuadas nas micrografias obtidas pela retirada da tela do trajeto dos elétrons, os quais incidirão sobre um filme fotográfico. Como as emulsões fotográficas são sensíveis aos elétrons, elas registram a imagem fornecida pelo aparelho. Depois de revelados, os filmes são ampliados 2 a 4 vezes e as micrografias podem ser examinadas à vontade.

A tela fluorescente, constituída por partículas relativamente grosseiras, emite pouca luz, em relação aos elétrons que recebe, e fornece imagem menos contrastada do que a obtida nas ampliações fotográficas. Por isso, os estudos de microscopia eletrônica são feitos, principalmente, nas ampliações em papel fotográfico mais do que diretamente no microscópio eletrônico.

No microscópio eletrônico, todo o trajeto dos elétrons é feito no vácuo, condição necessária para a obtenção de um feixe de elétrons, que seriam desviados ao colidirem com os átomos do ar. Por isso, não se podem examinar células vivas, mas apenas células fixadas e completamente secas. Todavia, há aparelhos que usam baixo vácuo e podem ser usados para exame de material contendo água, embora sem que se possa obter a boa resolução fornecida pelo microscópio eletrônico comum, que é de alto vácuo.

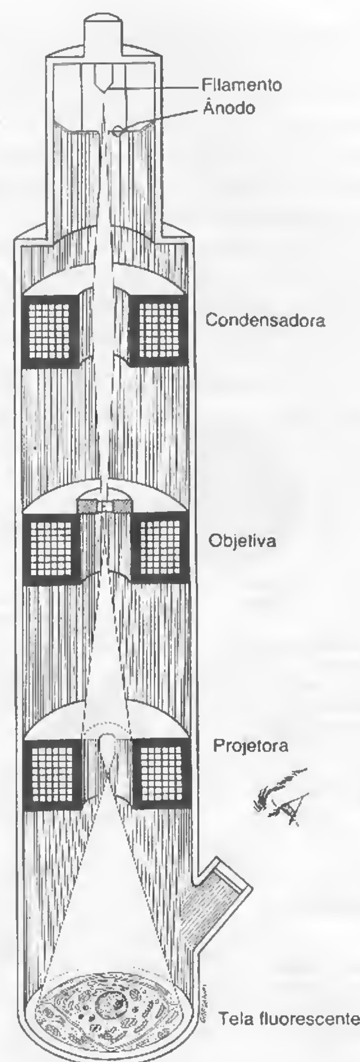


Fig. 2.10 Trajeto dos elétrons no microscópio eletrônico. O corte de tecido é colocado logo acima da bobina ou lente objetiva. A imagem, já aumentada pela objetiva, é novamente ampliada por outra bobina, que a projeta em uma tela fluorescente.

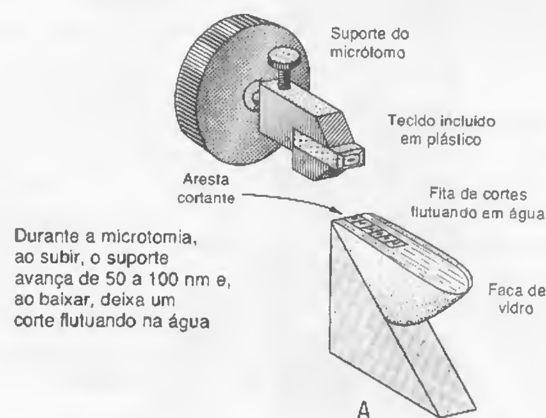
A preparação das células para a microscopia eletrônica requer cuidados muito especiais. A fixação em geral é feita em solução de aldeído glutárico (glutaraldeído) tamponado a pH 7,2. Usa-se também a fixação, em solução de tetróxido de ósmio. Na maioria das vezes, esses dois fixadores são empregados em seqüência: primeiro fixa-se o tecido em glutaraldeído e, depois, em ósmio. O ósmio, além de fixador, atua como contraste, por ser um elemento de número de massa elevado, que desvia os elétrons. As estruturas que se combinam com o ósmio aparecerão escuras.

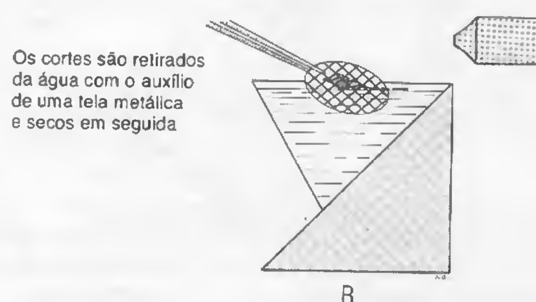
Além do ósmio, outros átomos são empregados para fixar e aumentar o contraste entre os componentes celulares. Após a fixação com aldeído glutárico, seguida da fixação com ósmio, podem-se passar ainda as células por soluções de sais de urânio ou chumbo. Como as diversas estruturas celulares têm afinidades diferentes por esses metais, o contraste melhora quando mais de um deles é usado.

Devido ao fraco poder de penetração dos feixes de elétrons utilizados nos microscópios eletrônicos, as células devem ser

cortadas com uma espessura de 20 a 100 nm. Para isto é necessária a inclusão em resina epóxi (Epon, Araldite). Os cortes são feitos em micrótomos especiais, que utilizam navalhas de vidro fraturado ou de diamante (Fig. 2.11).

Além do método de contraste com metais que se ligam aos tecidos, chamados de contraste ou **coloração positiva**, usa-se também a chamada **coloração negativa** (Fig. 2.12). Na coloração negativa, células, organelas isoladas ou vírus são mergulhados em soluções contendo átomos que desviam os elétrons e, depois, examinados no microscópio eletrônico. O **corante negativo** fica entre as estruturas e penetra em suas depressões e





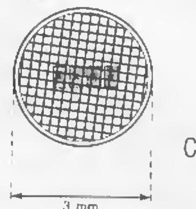


Fig. 2.11 Algumas etapas da obtenção dos cortes para a microscopia eletrônica. Os tecidos são incluídos em blocos de resina epóxi. Em **A**, vê-se o suporte do micrótomo com o bloco a ser cortado e a navalha de vidro. Preso à navalha, há um pequeno recipiente contendo água, sobre a qual os cortes serão recolhidos. Em **B**, os cortes estão sendo colhidos em uma tela de 3 mm de diâmetro, manejada por meio de uma pinça. Em **C**, aparece a tela com os cortes. Esta tela é submetida à solução de sais de uranila e chumbo, que impregnam os componentes celulares, aumentando seu contraste. Em seguida, a tela é levada ao microscópio eletrônico.

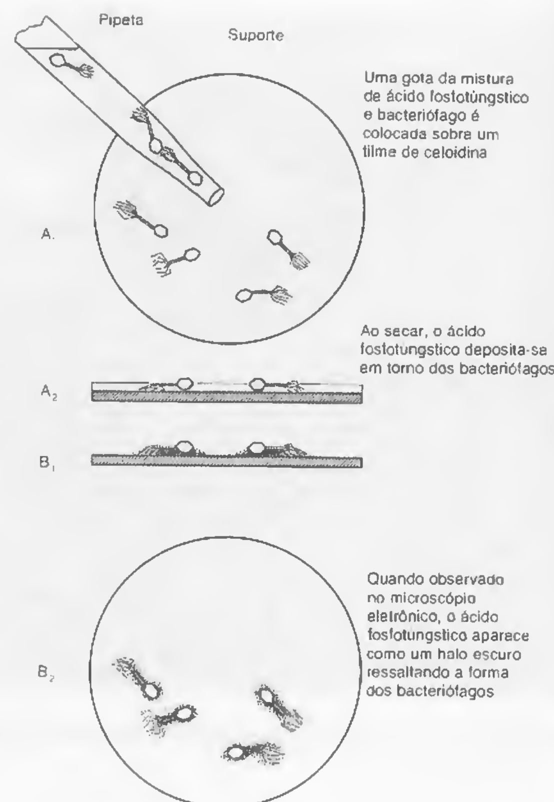


Fig. 2.12 Esquema da técnica de **coloração negativa** aplicada à evidenciação de bacteriófago (vírus de bactéria), neste exemplo. Com o auxílio de uma pipeta, coloca-se sobre um suporte adequado uma solução de ácido fosfotúngstico contendo bacteriófagos em suspensão (**A_1** e **A_2**). Após a secagem (**B_1** e **B_2**), o ácido fosfotúngstico, que desvia o trajeto dos elétrons, acumula-se em volta dos bacteriófagos. No microscópio eletrônico, os bacteriófagos aparecem claros contra um fundo escuro.

orifícios, de modo que, ao microscópio, a estrutura aparece clara, contornada por um material elétron-denso, que é o **corante**. Esta técnica é muito empregada no estudo de vírus e de organelas isoladas.

Em certos casos, sobretudo no estudo dos vírus, usa-se também a técnica de **sombreamento**, em que se faz vaporização de um metal sobre uma estrutura, segundo um certo ângulo (Fig. 2.13). Como só um lado da estrutura é recoberto pela camada metálica que se deposita durante o processo, sua forma aparece em relevo.

Microscópio eletrônico de varredura. Como o microscópio eletrônico comum ou de transmissão, o microscópio eletrônico de varredura também usa um feixe de elétrons. Mas, daí em diante, eles pouco têm em comum e, na verdade, são aparelhos complementares. O microscópio eletrônico de transmissão possui poder de resolução muito maior, enquanto o de varredura tem a vantagem de fornecer imagens tridimensionais, pelo exame da superfície das estruturas.

Basicamente, o microscópio eletrônico de varredura (Fig. 2.14) consiste em um sistema análogo ao do microscópio de transmissão, que produz um feixe delgado de elétrons cujo diâmetro pode ser modificado. O trajeto do feixe de elétrons é, em seguida, modificado por um conjunto de bobinas defletoras que o fazem percorrer o espécimen ponto por ponto e ao longo de linhas paralelas (varredura).

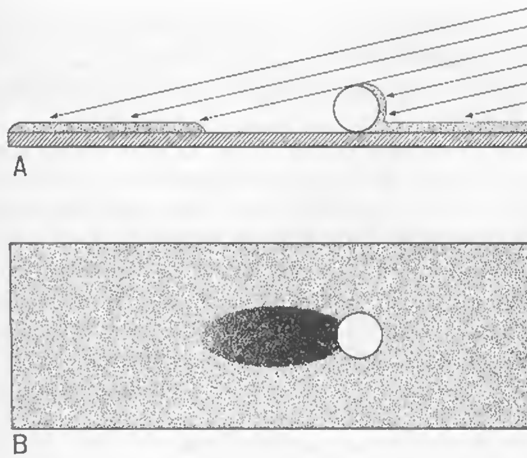


Fig. 2.13 A técnica do sombreamento consiste na deposição de fina camada de metal (ouro, cromo, urânio) sobre a célula em estudo. O metal é evaporado no vácuo e deve incidir obliquamente sobre o espécimen, como mostra o esquema **A**. Em **B**, aspecto visto no microscópio eletrônico.

Filamento
Ânodo
Coluna em vácuo
Bobinas ou lentes magnéticas
Controles de varredura e aumento
Gerador de varredura
Bobinas de varredura
Coletor
Espécimen
Amplificador
Tela de observação
Elétrons secundários
Bombas de vácuo

Fig. 2.14 Esquema geral do microscópio eletrônico de varredura. Na parte inferior do aparelho estão localizadas as bombas de vácuo, pois a coluna percorrida pelos elétrons deve ser mantida em alto vácuo.

Ao atingirem o espécimen, os elétrons causam diversos efeitos, entre os quais a emissão de **elétrons secundários** pelo próprio espécimen. Os elétrons secundários são colhidos por um coletor, passam por um sistema de amplificação e são transformados em pontos de maior ou menor luminosidade num monitor de vídeo. As micrografias são obtidas pela fotografia da imagem na tela do monitor, e não pela ação dos próprios elétrons sobre um filme fotográfico, como acontece no microscópio eletrônico de transmissão.

Geralmente, os espécimens não precisam ser cortados para serem examinados no microscópio eletrônico de varredura. Objetos de 1 cm ou mais podem ser examinados inteiros. Em biologia celular, o microscópio de varredura tem sido muito usado para o estudo da superfície de células mantidas em cultivo. O material a ser estudado, após fixação em glutaraldeído ou outro fixador, é cuidadosamente dessecado e recoberto por delgada camada condutora de eletricidade — em geral, ouro ou platina depositados a vácuo — e está pronto para ser examinado no aparelho.

Citoquímica: compreende técnicas diversas para a identificação e localização das moléculas que constituem as células

A citoquímica estuda a localização intracelular das diversas substâncias que compõem as células. Pode ser aplicada em nível de microscopia óptica e de microscopia eletrônica. No primeiro caso, o produto da reação citoquímica deve ser corado e, no segundo, deve dispersar os elétrons, isto é, possuir "elétron-densidade".

Algumas reações citoquímicas seguem a lei de Lambert-Beer, quer dizer, produzem nas células e tecidos uma intensidade de cor proporcional à concentração da substância em estudo. Nestes casos, é possível usar um aparelho denominado **histofotômetro** ou **citofotômetro**, que permite determinar a intensidade da cor produzida dosando, por este meio, a quantidade da substância analisada.

Ácido desoxirribonucléico. O DNA é demonstrado citoquimicamente pela reação de Feulgen, técnica que consiste em duas etapas. Na primeira, mergulha-se a lâmina em solução aquecida de ácido clorídrico, o que promove a hidrólise das bases púricas, deixando livres as extremidades da desoxirribose, que possuem radicais aldeídicos. Na segunda etapa, trata-se o preparado pelo reativo de Schiff, que, ao se combinar com os grupamentos aldeídicos da desoxirribose, forma um complexo de cor vermelha. O reativo de Schiff é uma solução de fucsina básica descorada pelo anidrido sulfuroso.

A reação de Feulgen é específica para o DNA e, como a intensidade da cor vermelha que se forma é proporcional à concentração de DNA, ela permite o estudo quantitativo deste ácido nucléico. Graças a este processo, descobriu-se que a quantidade de DNA é fixa para cada espécie e se duplica na intérfase, de modo que, ao entrar na prófase, a célula já contém uma quantidade dupla de DNA.

Ácido ribonucléico. O estudo citoquímico do RNA é baseado em sua basofilia e nas propriedades da enzima **ribonuclease**, que ataca exclusivamente o RNA.

São feitas duas preparações, uma das quais é digerida pela ribonuclease. Depois, as duas preparações são tratadas por um corante básico, como o azul-de-toluidina. Por ser fortemente basófilo, o RNA aparecerá corado. Pela comparação das duas lâminas ao microscópio, torna-se possível detectar o RNA, pois este só aparecerá corado na lâmina que não foi digerida pela ribonuclease.

Catecolaminas. O formaldeído reage com as catecolaminas produzindo compostos fluorescentes. Deste modo, é possível a localização citoquímica das catecolaminas adrenalina e noradrenalina (Fig. 2.15).

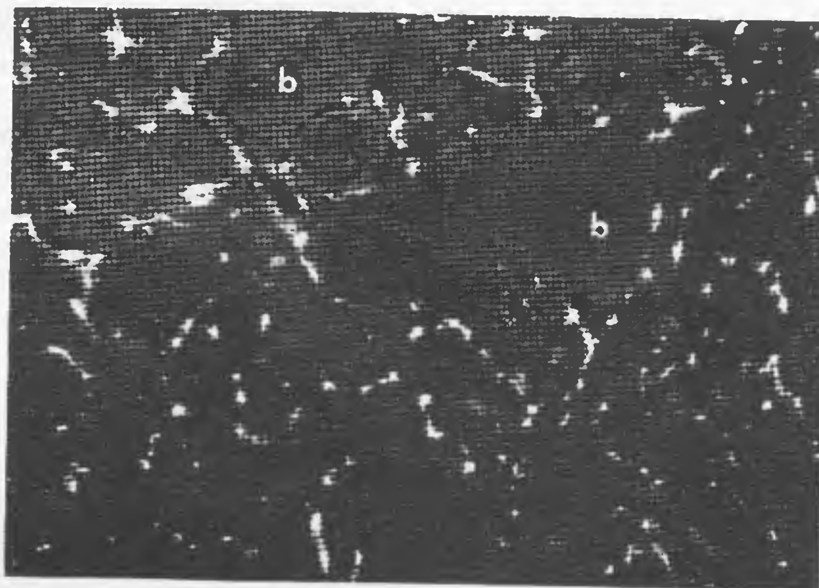


Fig. 2.15 Glândula salivar de sagüi. Método de Falck e Hillarp para demonstração de catecolaminas pela fluorescência. Fibras nervosas contendo adrenalina (adrenérgicas) aparecem fluorescentes e localizadas em redor das unidades secretoras. Os ductos (d) são desprovidos de inervação. Aumento: 280 ×. (Cortesia da Dra. Conceição Machado.)

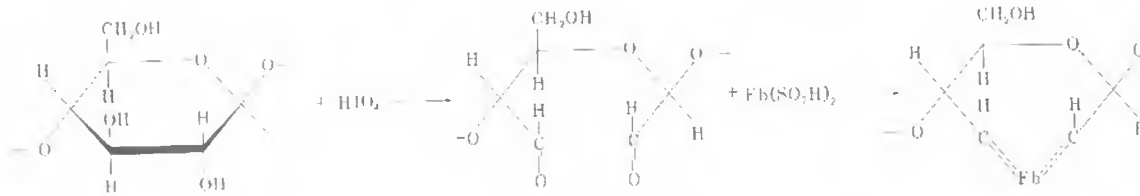


Fig. 2.16 Reação do ácido periódico e reativo de Schiff (reação PAS). Fb, fucsina básica.

Proteínas. As reações para demonstração das proteínas totais das células são baseadas em técnicas que identificam aminoácidos. Entre estas técnicas estão a de Millon, para tirosina; a do diaminoazobenzeno, para triptófano; e a de Sakaguchi, para arginina.

As diversas proteínas celulares são constituídas pelos mesmos aminoácidos; por isso, as técnicas baseadas na identificação de aminoácidos não permitem individualizar as proteínas, o que pode ser feito com métodos de imunocitoquímica (ver adiante, neste capítulo).

Polissacarídeos. Um exemplo é a técnica para evidenciação do glicogênio, conhecida como técnica do **PAS** (*periodic acid* Schiff). Como indica a Fig. 2.16, a reação baseia-se na oxidação, pelo ácido periódico, de grupamentos OH vizinhos, formando grupamentos aldeídicos que dão cor vermelha com o reativo de Schiff. Como foi explicado anteriormente, o reativo de Schiff é a fucsina básica descorada pelo anidrido sulfuroso. A reação não é específica para glicogênio, de modo que se aplica um artifício semelhante ao descrito para a demonstração do RNA: tomam-se duas lâminas com cortes do mesmo tecido, uma das quais é previamente tratada pela enzima alfa-amilase. Esta enzima hidrolisa e remove o glicogênio. Portanto, a estrutura que aparecer corada pelo PAS na lâmina não tratada pela alfa-amilase mas não aparecer corada na lâmina tratada pela enzima é glicogênio.

Enzimas. Muitas enzimas podem ser estudadas por técnicas citoquímicas. Algumas vezes, para impedir que o fixador inative a enzima, é preciso usar cortes de tecidos não fixados, obtidos por congelação. As desidrogenases e as fosfatases são exemplos de enzimas demonstráveis citoquimicamente.

As desidrogenases retiram o hidrogênio de um substrato, transferindo-o para outro composto. Existem nas células muitas desidrogenases diferentes, que se distinguem pela natureza do substrato sobre o qual atuam. Chama-se **substrato** ao composto atacado pela enzima. A demonstração citoquímica das desidrogenases é feita pela incubação de cortes de tecidos frescos (não fixados) em uma solução contendo o substrato adequado e um **tetrazol**. Sob a ação da enzima, o substrato cede hidrogênio, que, então, vai ser fixado pelo tetrazol. Ao ser reduzido pelo hidrogênio, o tetrazol transforma-se em um composto corado e insolúvel, chamado **formazana**, que se precipita no local onde se processou a reação enzimática. Assim, aparece uma coloração nos locais da célula que possuem a desidrogenase específica para o substrato usado no meio onde o tecido foi incubado.

As fosfatases ácidas são enzimas que hidrolisam ésteres do ácido fosfórico em pH ácido. Existem diversas técnicas para demonstração dessas enzimas.

Uma das técnicas para as fosfatases ácidas utiliza meio de incubação contendo glicerofosfato de sódio e nitrato de chumbo, em tampão pH 5,0. A enzima hidrolisa o glicerofosfato, formando-se um precipitado insolúvel e incolor de fosfato de chumbo. Em seguida, os cortes são mergulhados em solução de sulfeto de amônia, que transforma o precipitado incolor do fosfato de chumbo em um precipitado negro de sulfeto de chumbo. Como os sais de chumbo são elétron-densos, a reação pode ser vista ao microscópio eletrônico. Esta técnica é usada para o estudo dos lisosomas — organelas ricas em enzimas hidrolíticas, entre as quais estão as fosfatases ácidas.

A microscopia de fluorescência é geralmente aplicada com técnicas citoquímicas

As substâncias fluorescentes gozam da propriedade de emitir luz quando excitadas por radiações de certos comprimentos de onda. Na prática utiliza-se a radiação ultravioleta como excitadora.

Alguns constituintes celulares, como a riboflavina (vitamina B_2), a vitamina A e as porfirinas, são fluorescentes e podem ser identificados e localizados por meio da microscopia de fluorescência.

Utilizam-se também corantes fluorescentes que se combinam e identificam certas substâncias não-fluorescentes normalmente presentes nas células. Um dos corantes fluorescentes mais usados é o alaranjado-de-acridina, que se combina com os ácidos nucléicos, permitindo a sua localização.

Todavia, a principal aplicação da microscopia de fluorescência ocorre em combinação com métodos imunológicos, nas técnicas imunocitoquímicas que utilizam anticorpos conjugados a compostos fluorescentes, e que serão descritas a seguir.

A imunocitoquímica localiza moléculas protéicas específicas

As técnicas de imunocitoquímica permitem o estudo da localização intracelular de **proteínas específicas**. Ela localiza, com precisão, um determinado tipo de molécula protéica, excluindo todas as outras proteínas existentes nas células.

Como a imunocitoquímica se baseia na reação antígeno-anticorpo, devem-se estudar antes algumas noções básicas desta reação, cujo estudo pertence ao domínio da imunologia. Textos de imunologia devem ser consultados para maiores detalhes.

Imunocitoquímica direta. Suponha-se que, de um determinado órgão de rato, se possa extrair e purificar quimicamente uma proteína, que será chamada proteína X. O problema citoquímico consiste em descobrir em que células ou parte da célula está localizada a proteína X, pois ela foi isolada de um órgão inteiro.

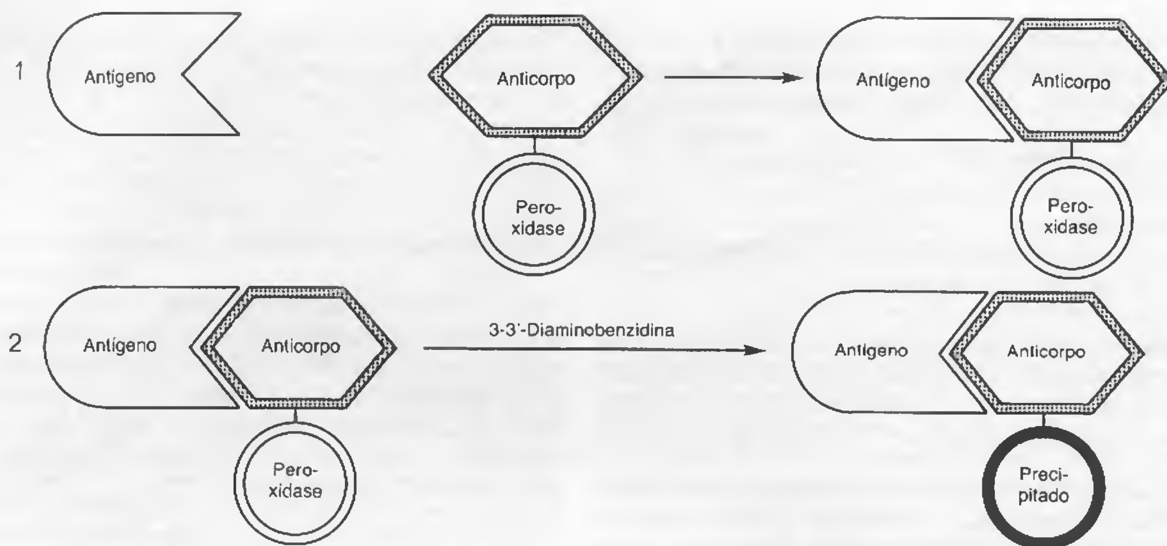


Fig. 2.17 Técnica imunocitoquímica direta. O composto (precipitado) formado pela ação da peroxidase sobre a 3-3'-diaminobenzidina é de cor marrom-clara e elétron-denso. Por isso, a técnica pode ser aplicada tanto à microscopia óptica como à eletrônica.

Injetando-se a proteína X (antígeno) em um coelho, este formará uma gamaglobulina (anticorpo) com a propriedade de se combinar exclusivamente com a proteína X, não se combinando com qualquer outra. O anticorpo aparece porque a proteína X pertence a um órgão de rato e, portanto, estranha para o coelho no qual foi injetada.

Algum tempo após a injeção da proteína X no coelho, pode-se obter do sangue deste animal um anticorpo específico contra aquela proteína. Esse anticorpo pode ser, por exemplo, combinado com a enzima peroxidase, que serve como marca. A identificação citoquímica da peroxidase identifica também o anticorpo ligado à enzima.

Colocando-se, sobre um corte do órgão de rato que contém a proteína X, uma solução do anticorpo marcado com a peroxidase, haverá uma combinação do antígeno (proteína X) com seu anticorpo (gamaglobulina anti-X) marcado com peroxidase (Fig. 2.17). O complexo antígeno-anticorpo que se forma não é visível ao microscópio óptico nem ao eletrônico, mas tornar-se-á visível se a peroxidase for evidenciada por uma reação citoquímica apropriada.

Esta evidenciação é feita colocando-se sobre o corte uma substância que, sob a ação da peroxidase, forme um composto corado e elétron-denso. No exemplo da Fig. 2.17, o composto sobre o qual a peroxidase atua é a 3-3'-diaminobenzidina; ao ser atacada pela peroxidase, a 3-3'-diaminobenzidina transforma-se em um composto insolúvel, marrom-claro e elétron-denso.

Em substituição à peroxidase, pode-se usar, como marcador, um corante fluorescente ligado ao anticorpo (Fig. 2.18). Neste caso, o preparado obtido pela ação do anticorpo sobre o corte que contém o antígeno pode ser imediatamente examinado ao microscópio de fluorescência. Todavia, a peroxidase permite melhor localização, pois o corte pode ser estudado com o microscópio eletrônico e o antígeno localizado, com alta resolução, nas organelas celulares.

Uma terceira forma de marcar o anticorpo consiste em sua conjugação com **ferritina**. A ferritina, uma proteína que, devido ao seu alto teor em ferro, é muito elétron-densa, possibilita o estudo da localização de proteínas (antígenos) ao microscópio eletrônico. Esta marcação não serve para o estudo ao microscópio óptico.

Mais recentemente surgiu a marcação com o complexo de ouro coloidal + proteína A (Figs. 2.19 e 2.20). Esta técnica consiste

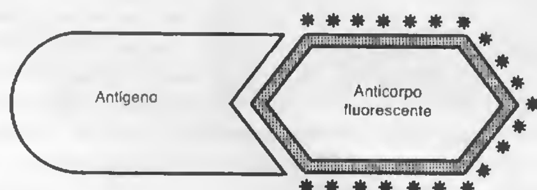


Fig. 2.18 Imunocitoquímica direta com anticorpo fluorescente.

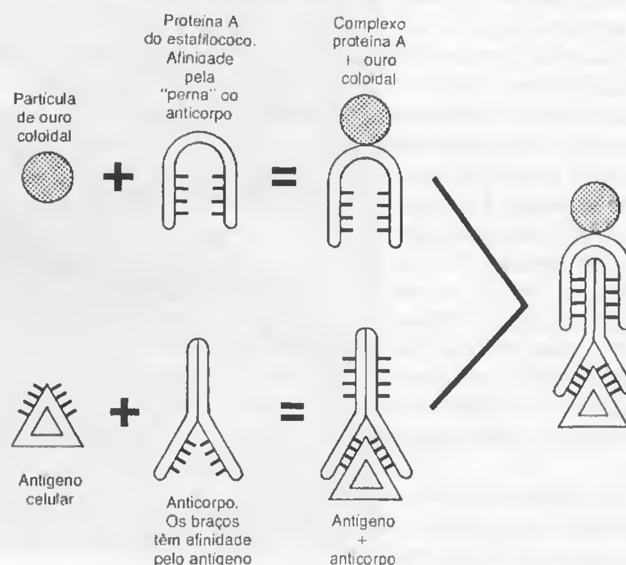


Fig. 2.19 Desenhos esquemáticos mostrando os fundamentos da técnica de imunocitoquímica usando como marcador o complexo de proteína A (uma proteína de estafilococo) e partículas de ouro coloidal.

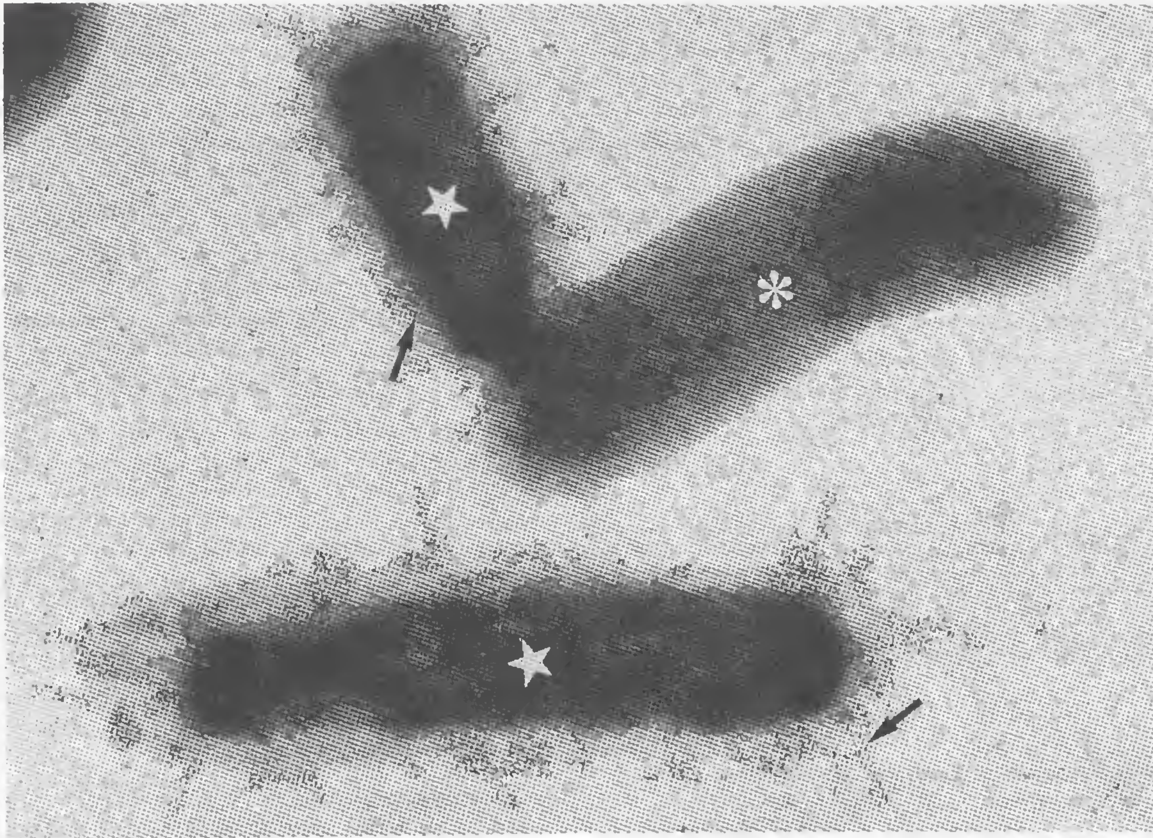


Fig. 2.20 Eletromicrografia de um preparado total da bactéria *Haemophilus aegyptius*, causadora da febre purpúrica brasileira. Notem-se na figura dois tipos celulares, onde as células assinaladas por estrelas mostram projeções filamentosas marcadas pelo complexo proteína A-ouro, ligado a um anti-soro policlonal anti-25kD. A proteína 25-kD é uma subunidade protéica da fímbria. A célula assinalada por um asterisco não mostra projeções filamentosas. Observa-se, em algumas oportunidades, a disposição linear (que revela a estrutura filamentosa da fímbria, **seta**) das partículas de ouro elétron-dispersantes, que medem aproximadamente 5 nm de diâmetro. Aumento: 63.000 ×. Gentileza da Dra. Hatune Tanaka do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo).

na adsorção, pelas moléculas da proteína A, de partículas de ouro, muito pequenas (5-20 nm) e elétron-densas. A proteína A é extraída das bactérias *Staphylococcus aureus* e, além da afinidade pelo ouro coloidal, tem afinidade por uma região comum às moléculas de todos os anticorpos (segmento Fc). Esta técnica apresenta grande precisão para localizar moléculas protéicas e grande resolução, pois as partículas de ouro coloidal são muito pequenas. O processo pode ser feito em três etapas: 1.ª) incubar o tecido a ser estudado com o anticorpo desejado; lavar; o anticorpo fixa-se à proteína; 2.ª) incubar o tecido em solução de ouro conjugado à proteína A; lavar; 3.ª) estudar no microscópio eletrônico.

A técnica direta de imunocitoquímica não é muito sensível e, por isso, pouco usada atualmente. Ela foi descrita aqui para facilitar a compreensão da técnica indireta, muito mais útil na prática por sua alta sensibilidade.

Imunocitoquímica indireta. Nesta técnica, a marcação é colocada em um antianticorpo, isto é, uma antigamaglobulina. Por sua maior sensibilidade (Fig. 2.21), permitindo a demonstração de quantidades mínimas de antígeno, a técnica indireta é a mais usada na prática.

As etapas da técnica indireta, que utiliza dois anticorpos, estão esquematizadas na Fig. 2.22. Supondo-se que se queira sa-

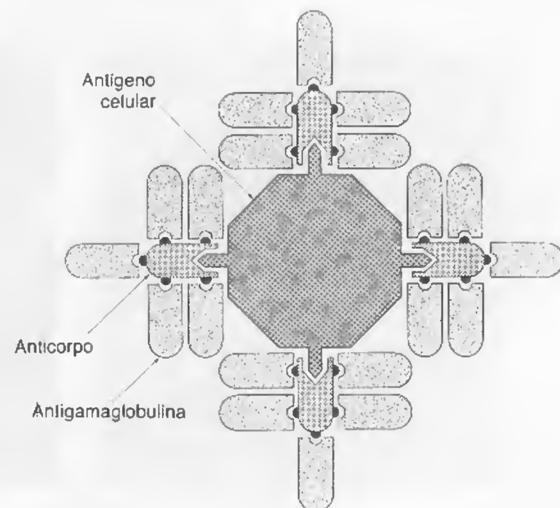


Fig. 2.21 Esquema para demonstrar a maior sensibilidade da imunocitoquímica indireta. Pela técnica direta, este antígeno celular fixaria quatro moléculas do anticorpo; pela técnica indireta, ele fixou 20 moléculas de antigamaglobulina.

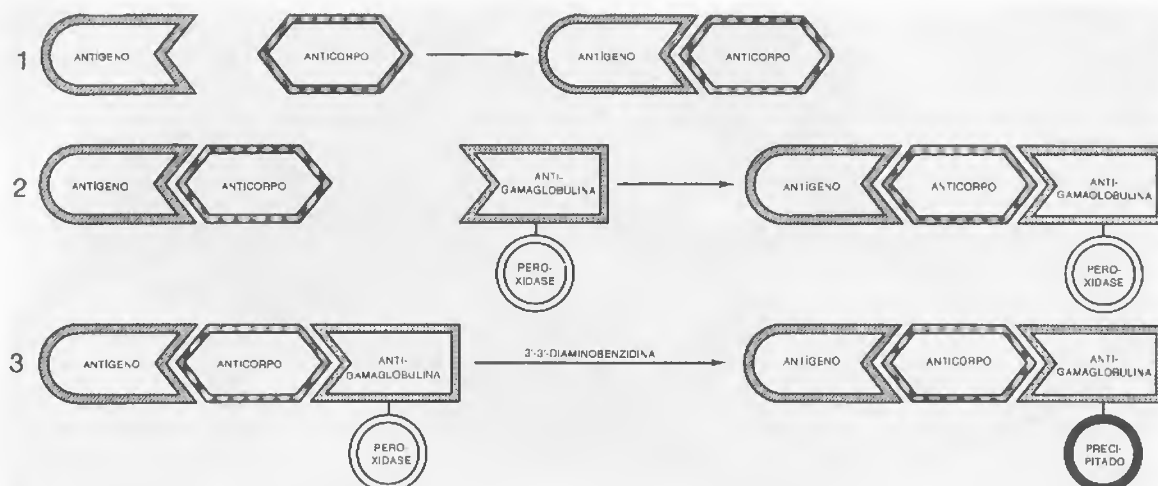


Fig. 2.22 Esquema demonstrativo das etapas da técnica imunocitoquímica indireta. Na **etapa 1**, o antígeno cuja localização se deseja determinar combina-se com o anticorpo específico, formando um complexo que não é visível nem no microscópio óptico, nem no eletrônico. A finalidade das etapas seguintes é tornar este complexo visível. Na **etapa 2**, agrega-se antigamaglobulina marcada com peroxidase ao complexo já formado. Na **etapa 3**, por meio da técnica citoquímica para peroxidase, forma-se precipitado visível nos microscópios óptico e eletrônico, revelando-se assim o local onde está presente o antígeno cuja localização era desejada.

ber a localização celular da proteína Y, também contida em um órgão de rato, a primeira etapa consiste na colocação, sobre o corte de tecido, de uma solução do anticorpo (gamaglobulina) anti-Y, obtido pela injeção da proteína Y em um coelho. Haverá combinação de Y com seu anticorpo.

Na segunda etapa, coloca-se sobre o corte uma solução de anticorpo contra gamaglobulina de coelho. Este anticorpo, que é uma antigamaglobulina e, portanto, um antianticorpo, pode ser obtido pela injeção de gamaglobulina de coelho em carneiro ou cabra.

Afinal, ter-se-á um complexo constituído pela proteína Y, seu anticorpo e uma antigamaglobulina. A antigamaglobulina pode ser evidenciada por conjugação com substâncias fluorescentes (Fig. 2.23), ferritina ou peroxidase, conforme foi descrito na técnica direta.

Macromoléculas como proteínas, DNA e RNA podem ser isoladas por cromatografia em coluna

As proteínas e os ácidos nucléicos isolados das células são freqüentemente separados pela técnica de **cromatografia em coluna**. Esta técnica baseia-se no fato de que, quando se faz uma mistura de proteínas dissolvidas em água passar por uma coluna constituída por uma **matriz** sólida e porosa, contida num tubo de vidro, a velocidade de migração das diferentes proteínas varia conforme a interação de cada uma delas com a matriz. Mandando-se um fluxo contínuo de proteínas, que sai pela parte in-

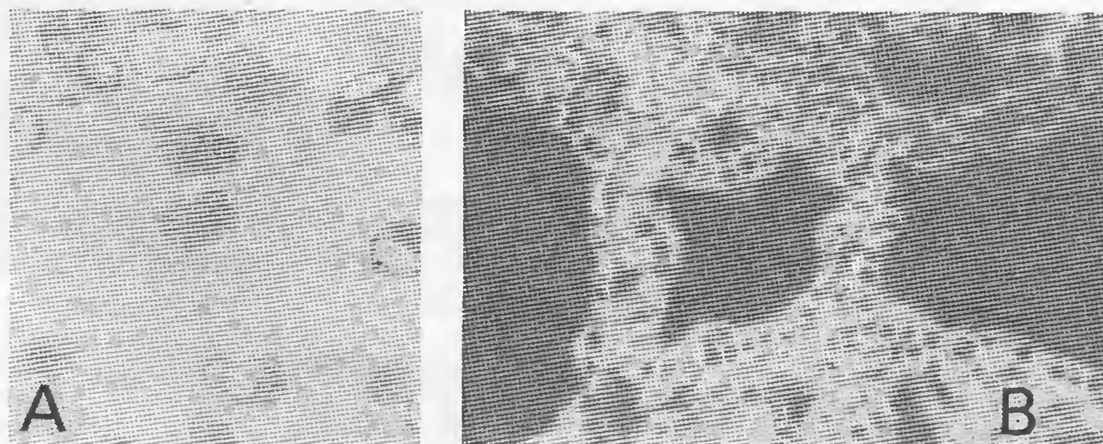


Fig. 2.23 Exemplos da técnica imunocitoquímica indireta. **A**. Células hipofisárias produtoras do hormônio luteinizante. Fotomicrografia no microscópio óptico comum. Aumento: 500 ×. (Cortesia dos Drs. Flávio Fava de Moraes e Burton R. Baker.) **B**. Células da glândula tireóide. Fotomicrografia no microscópio de fluorescência. Aumento: 400 ×. (Cortesia do Dr. Mário Camargo.)

ferior da coluna, podem-se coletar separadamente as proteínas contidas na amostra inicial.

O grau e o tipo de interação das proteínas com a matriz da coluna podem ser de natureza variável, a saber:

a) **interação de troca iônica** — onde a matriz é constituída por partículas com carga positiva ou negativa e na qual a separação das proteínas depende das cargas elétricas na superfície de suas moléculas;

b) **interação hidrofóbica** — as partículas da matriz apresentam superfície hidrofóbica, retardando a migração das proteínas hidrofóbicas, que têm afinidade pelas partículas da matriz;

c) **filtração em gel** — neste caso, a matriz atua apenas como uma peneira, por onde as proteínas migram com velocidade variável, dependendo do tamanho e forma de suas moléculas;

d) **interação por afinidade** — muitas moléculas biológicas interagem com alto grau de especificidade, como acontece entre as enzimas e seus substratos, entre certos segmentos de DNA e RNA e entre antígenos e anticorpos. A técnica é, por exemplo, muito usada para purificação de anticorpos. Neste procedimento, as moléculas (anticorpos) ligam-se às partículas da matriz que contêm o respectivo antígeno. As outras proteínas passam pela coluna, mas os anticorpos se prendem à matriz com alta especificidade e afinidade. Posteriormente à passagem das outras proteínas, o anticorpo é removido da coluna, por meio de solução apropriada.

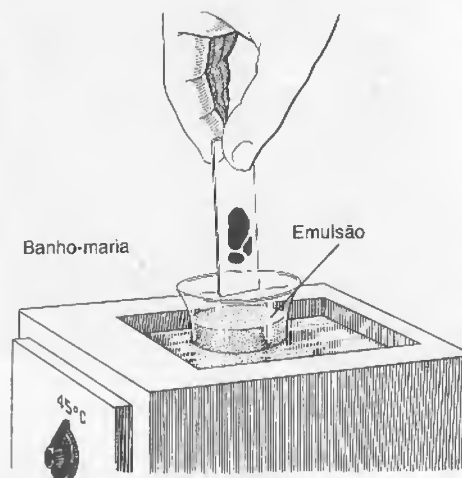
O tamanho das moléculas protéicas pode ser determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida

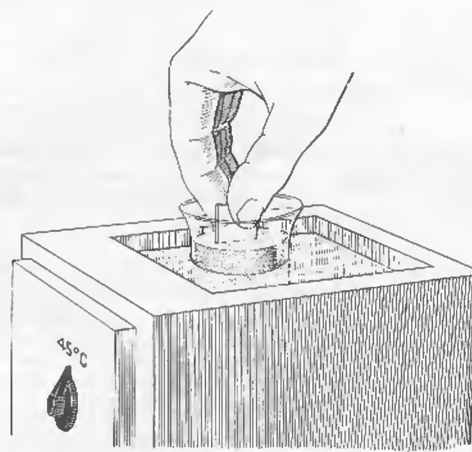
A técnica de eletroforese em gel tem diversas variantes, para esclarecer diferentes problemas. Uma dessas variantes é empregada para determinar o tamanho das moléculas protéicas e consiste na dissolução das proteínas em solução de *s*ódio *d*odecil *s*ulfonato (SDS). Este composto é um detergente forte, cujas moléculas são carregadas negativamente. Na presença de um excesso de moléculas negativas de SDS, todas as moléculas protéicas se tornam também negativas, porque todas as cargas positivas das proteínas são neutralizadas. Além disso, adiciona-se um agente redutor, geralmente mercaptoetanol, que rompe as ligações S-S das subunidades protéicas, destruindo a forma original das moléculas de proteínas. Colocando-se a mistura de proteínas sobre o gel e submetendo-se este a um campo elétrico, todas as moléculas protéicas migrarão na direção do pólo positivo e a velocidade desta migração dependerá exclusivamente do tamanho da molécula de cada cadeia polipeptídica.

A radioautografia é muito empregada para estudar os locais de síntese e o destino de macromoléculas

A radioautografia pode ser aplicada como uma técnica citoquímica para a detecção de isótopos radioativos. Baseia-se na sensibilidade das emulsões fotográficas às radiações ionizantes. Como não existem átomos radioativos nas células, podem-se seguir, pela radioautografia, a incorporação e a migração de compostos radioativos introduzidos nas células com finalidades experimentais.

Por exemplo, desejando-se saber quais as células de um tecido que estão sintetizando DNA, injeta-se num animal um pre-





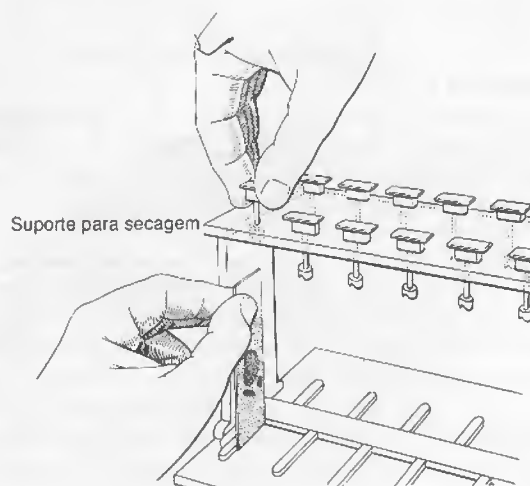


Fig. 2.24 Técnica radioautográfica com emulsão líquida. As etapas demonstradas nestes desenhos são executadas na câmara escura, com luz vermelha de segurança.

cursor deste ácido nucléico, a timidina radioativa marcada com trício (H^3). A timidina será incorporada apenas nos núcleos celulares que estiverem sintetizando DNA.

Cobrindo-se a lâmina que contém cortes do tecido, com uma emulsão fotográfica, esta será impressionada pelos núcleos celulares radioativos (partículas beta emitidas pelo trício). Revelando-se a emulsão, aparecerão grânulos negros de prata metálica sobre o núcleo celular cujo DNA foi sintetizado com a timidina-H^3. Depois de revelada a emulsão, as células podem ser coradas para facilitar seu estudo ao microscópio.

A radioautografia pode ser aplicada também ao microscópio eletrônico. O processo é basicamente o mesmo usado para o microscópio óptico, porém os grânulos de prata em geral aparecem como filamentos enovelados devido ao maior poder de resolução do microscópio eletrônico.

Das diversas técnicas radioautográficas, a mais empregada em biologia celular é a **técnica da emulsão líquida**. Esta técnica emprega emulsões fotográficas especiais, sob a forma de um gel que se torna líquido à temperatura de 45°C. As etapas são as seguintes (Figs. 2.24 e 2.25):

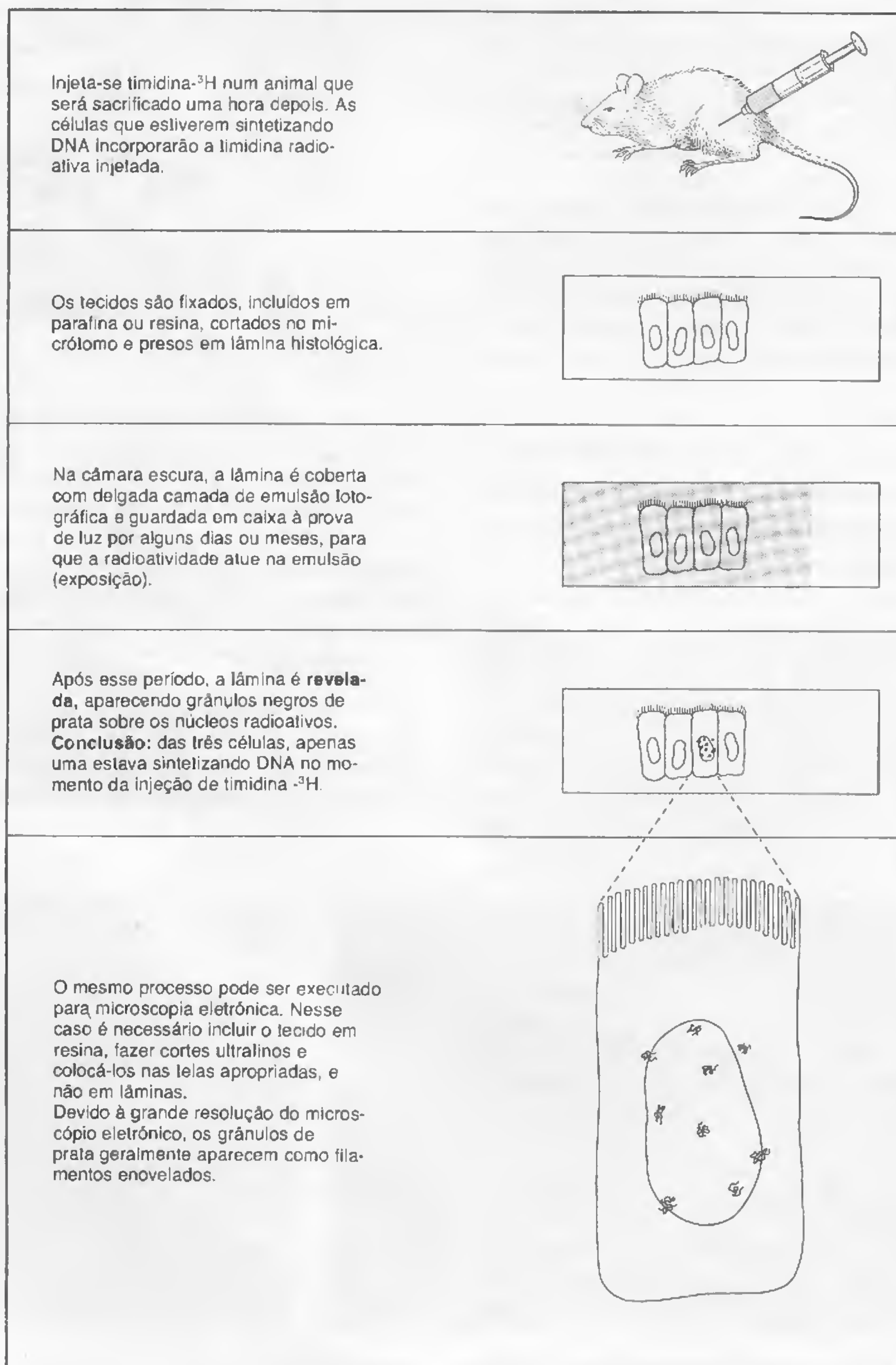


Fig. 2.25 Esquemas das diversas fases da técnica radioautográfica. Tomou-se como exemplo o estudo da síntese de DNA pela injeção de timidina radioativa.

1. Mergulha-se a lâmina contendo as células radioativas na emulsão fundida a 45°C.

2. Remove-se com papel absorvente a emulsão do verso da lâmina e deixa-se secar à temperatura ambiente.

3. Colocam-se os preparados em caixas à prova de luz, para o **período de exposição**, durante o qual a radiação irá atuar sobre a emulsão.

4. Após a exposição, revela-se a emulsão fotográfica, tratando-se a lâmina como se fosse uma pequena chapa fotográfica.

5. Em seguida, as células são coradas e examinadas ao microscópio. Grânulos negros de prata metálica indicarão as partes radioativas das células.

A radioautografia é muito usada para o estudo da síntese de diversas moléculas. Para isso, como no exemplo do DNA já citado, injeta-se em um animal ou coloca-se no meio de cultura de células um precursor radioativo da substância que se deseja estudar.

Para o estudo do RNA, pode-se usar adenina ou uridina (Fig. 2.26) e, para o estudo da síntese e migração de proteínas, empregam-se aminoácidos. Em geral, as moléculas radioativas usadas nestes experimentos são marcadas com hidrogênio (H^3), carbono (C^{14}), ou enxofre (S^{35}). Esses três isótopos emitem partículas beta (elétrons) de fraco poder de penetração, de modo que não causem dano às células. Para estudar o metabolismo normal, é preciso utilizar radiação fraca para que não haja alteração do funcionamento celular pela radiação. Outros isótopos radioativos também muito utilizados em radioautografia são o I^{131}, I^{125} e P^{32}.

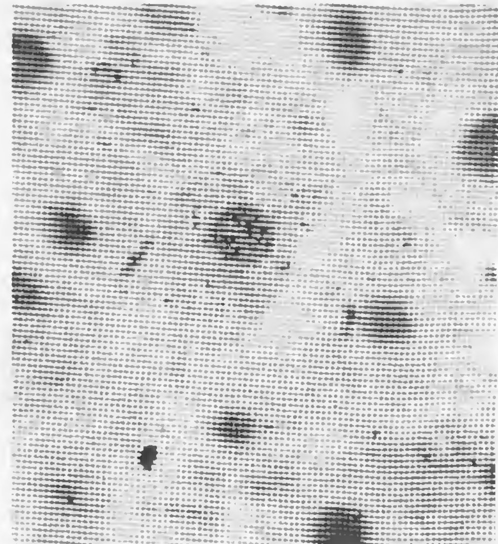


Fig. 2.26 Células hepáticas incubadas durante 1 hora em solução nutritiva contendo uridina-H^3. Esse nucleosídeo é utilizado pela célula para fabricar RNA. Notar a predominância dos grânulos de prata sobre o núcleo celular, indicando síntese de RNA. Coloração pela hematoxilina-eosina. Aumento: 1.500 ×.

Por centrifugação, é possível obter organelas celulares em estado de pureza e, em seguida, estudar suas propriedades químicas, físicas e biológicas

As técnicas que permitem o fracionamento celular e a obtenção de frações relativamente puras de organelas contribuíram muito para o desenvolvimento da biologia celular nos últimos anos.

As organelas são separadas pela centrifugação de um **homogeneizado** de células em que as membranas plasmáticas são rompidas e os constituintes celulares dispersos em um meio líquido, geralmente contendo sacarose. Este glicídio é muito utilizado porque mantém a integridade dos componentes celulares e evita a tendência de as organelas aglutinarem-se quando as células se rompem.

A ruptura das membranas plasmáticas para a obtenção do homogeneizado em geral é feita pela ação mecânica de um pistão girando em um cilindro que contém as células na solução de sacarose (Fig. 2.27). Pode ser feita também por meio de ultrasom ou de um aparelho parecido com um liquidificador doméstico.

Durante a homogeneização e as centrifugações que se seguem, a maioria das organelas mantém sua forma intacta. Todavia, o retículo endoplasmático se rompe, e, como suas membranas tendem a se soldar, formam-se vesículas lisas ou granulares, conforme se trate do retículo endoplasmático liso (REL) ou do rugoso (RER). As vesículas formadas a partir deste último, cuja superfície é carregada de ribosomas, recebem a denominação de **microsomas**. Portanto, os microsomas são fragmentos do retículo endoplasmático rugoso.

O isolamento de uma organela através da centrifugação depende do seu coeficiente de sedimentação, isto é, do seu tamanho, forma e densidade, bem como da densidade e viscosidade da solução em que está sendo centrifugada.

A separação de componentes celulares por centrifugação em geral é efetuada pela técnica conhecida por **centrifugação fracionada**, que consiste em uma série de centrifugações a velocidades crescentes (Fig. 2.27). As organelas ou inclusões maiores e mais densas sedimentam primeiro, e o sobrenadante de cada centrifugação é centrifugado de novo, porém com maior velocidade. Desse modo, os componentes celulares vão sendo sucessivamente separados, como mostra a Fig. 2.27.

As frações assim preparadas muitas vezes contêm mais de um componente celular, mas podem ser purificadas por ressuspensão e nova centrifugação. Por exemplo, a fração das mitocôndrias quase sempre contém lisosomas e peroxisomas, mas as três organelas podem ser separadas por novas centrifugações.

Em geral, o sobrenadante que permanece após a última centrifugação é denominado **fração solúvel**.

Outra técnica de fracionamento celular é a **centrifugação contragradiente**, em que as partículas são separadas por suas diferenças de densidade. O gradiente consiste em uma solução — que pode ser de sacarose — cuja concentração é máxima na parte profunda do tubo de centrifugação e mínima na superfície. Existe, portanto, no tubo, um gradiente de densidade crescente de cima para baixo. Logo após ter sido preparado o gradiente, coloca-se o homogeneizado sobre sua superfície e faz-se a centrifugação. Impulsionadas pela força centrífuga, as partículas penetram no gradiente. Cada tipo de partícula pára no local onde há equilíbrio entre a força centrífuga da partícula e a concentração do gradiente (Fig. 2.28).

As frações obtidas por qualquer técnica de fracionamento devem ser examinadas quanto à sua pureza. Para isto podem-se empregar os microscópios óptico e eletrônico, ou métodos bioquímicos que demonstram na fração a predominância de um composto que lhe é característico. Por exemplo, a fração dos lisosomas apresenta quantidade muito elevada de fosfatase ácida, enquanto a fração nuclear é muito rica em DNA.

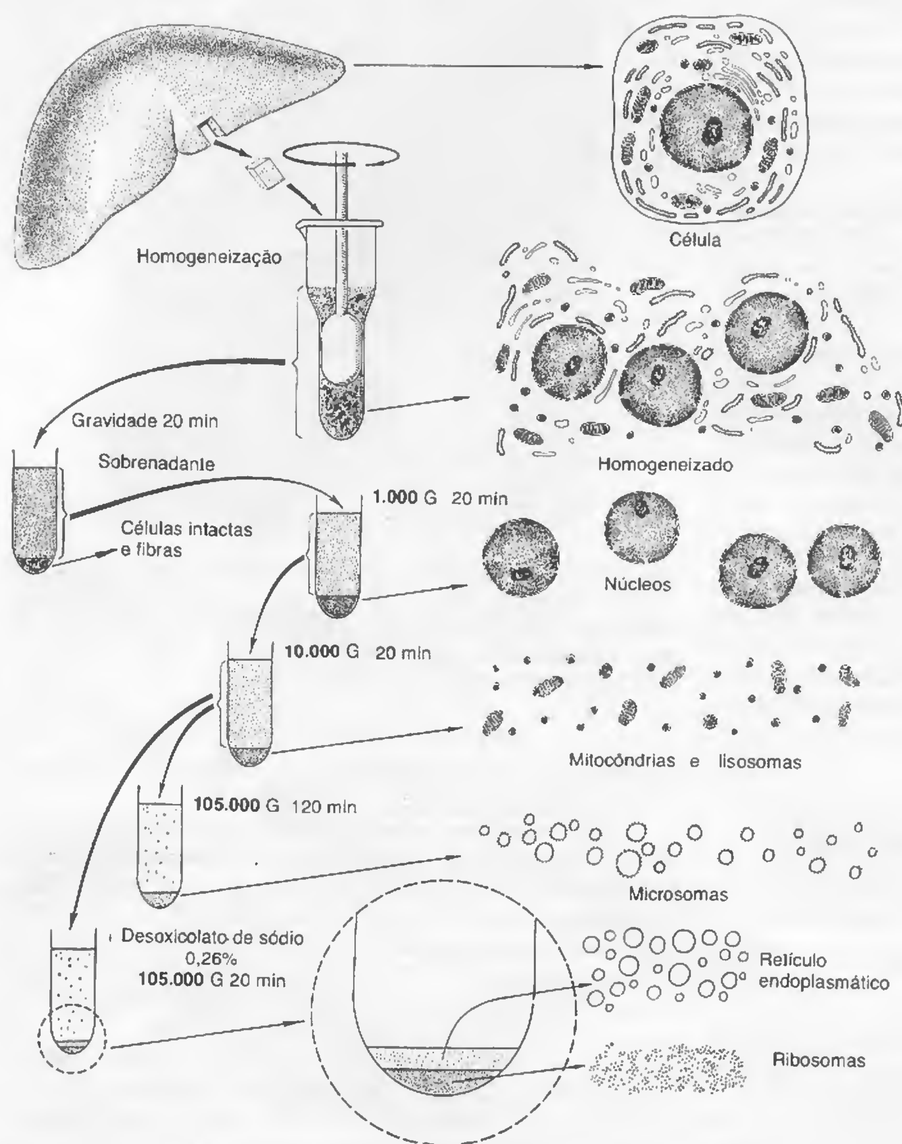


Fig. 2.27 Esquema da técnica de centrifugação fracionada. O sobrenadante de cada tubo é centrifugado novamente, cada vez com maior força centrífuga. Os desenhos da direita mostram os componentes celulares do sedimento de cada tubo. A força centrífuga é representada por G; 1.000 G significam 1.000 vezes a força da gravidade.

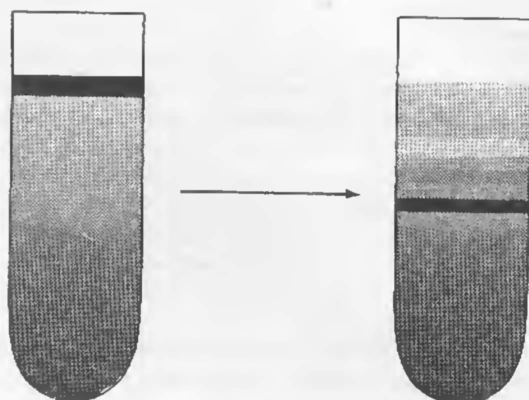


Fig. 2.28 Centrifugação contra gradiente. À **esquerda**, antes da centrifugação, com a amostra colocada sobre o gradiente de concentração de sacarose. À **direita**, após a centrifugação, mostrando as faixas, cada uma delas contendo, geralmente, um tipo de organela.

É possível estudar as organelas e inclusões isoladas por uma grande variedade de métodos. Sua composição química pode ser determinada e sua atividade metabólica estudada fora da célula e, portanto, em um meio rigorosamente controlado. Isoladas, as organelas não estão mais sujeitas aos mecanismos intracelulares de controle, de modo que seu funcionamento pode ser testado mais livremente pelo experimentador, embora as condições sejam artificiais, em comparação com o meio intracelular.

É possível separar as células de um tecido e isolar um determinado tipo celular

Vários procedimentos possibilitam a separação das células que constituem os tecidos. A primeira etapa geralmente consiste na destruição da arquitetura da matriz extracelular (por meio de enzimas como colagenase e tripsina) e das junções que unem as

células, muito freqüentes nos epitélios glandulares e de revestimento. Para isto, é preciso retirar os íons Ca^{2+}, que participam da aderência entre as células, com auxílio do EDTA (*ethilenediaminetetraacetic acid*) que capta os íons Ca^{2+} removendo-os do meio. Depois de separadas, as células continuam misturadas, e os tipos celulares desejados precisam ser isolados.

O isolamento das células pode ser feito de diversas maneiras. Elas podem ser isoladas por centrifugação, de acordo com seus tamanhos e densidade. Certas células, como os macrófagos, têm tendência para aderir ao vidro e a plásticos e, assim, podem ser isoladas das células que não têm essa tendência. Mas a maneira mais precisa e eficiente de isolar um único tipo celular em grande quantidade é pelo uso de um aparelho denominado **FACS** (*fluorescence-activated cell sorter*). As células em suspensão são tratadas com um anticorpo fluorescente que se ligue especificamente à superfície de certas células. À medida que a suspensão de células passa pelo aparelho, as células fluorescentes são desviadas para um recipiente, enquanto as não-fluorescentes serão colhidas em outro recipiente.

Estudo de células vivas e culturas de células animais e vegetais

As células retiradas do corpo de um animal ou de uma planta podem ser estudadas, por algum tempo, enquanto estão vivas. Para isso elas devem ser colocadas em meio isotônico, que não lhes causa alteração de volume. Como quase sempre os constituintes celulares são incolores e transparentes, torna-se necessário o uso do microscópio de contraste de fase. Em alguns casos, podem-se empregar **corantes supravitais**, que são pouco tóxicos e penetram na célula viva, corando determinadas estruturas. Um corante supravital bastante empregado é o verde-jano, que cora as mitocôndrias.

Quando se quer estudar células vivas por tempo mais longo, costuma-se cultivá-las em soluções nutritivas (meios de cultura), onde o comportamento e metabolismo celulares são estudados em condições mais bem definidas do que no corpo de um animal. As culturas possibilitam o estudo dos movimentos celulares, da mitose, da ação de diversas substâncias sobre as células e da secreção, pela célula, de produtos que irão acumular-se no meio de cultura.

As culturas são feitas principalmente em frascos, com células isoladas dos tecidos pela aplicação de diversas técnicas, como foi mencionado anteriormente. A maioria das células não vive em suspensão em meio líquido, necessitando de uma superfície sólida sobre a qual crescem e se dividem. Essa superfície pode ser a própria parede dos frascos de plástico onde os cultivos são feitos. Porém, a maioria das células não adere à parede do frasco, a não ser que esta esteja recoberta por um material tecidual, como o colágeno. O cultivo em frasco possibilita o emprego de meios de cultura quimicamente definidos, constituídos por aminoácidos, glicídios, sais minerais, vitaminas e **fatores de crescimento**, que são proteínas específicas, estimuladoras da proliferação e diferenciação de certos tipos celulares. Um exemplo é o fator de crescimento para células nervosas ou NGF (*nerve growth factor*). Na ausência deste fator não se podem cultivar células nervosas.

As células retiradas do corpo de um animal e cultivadas diretamente constituem as **culturas primárias**. Em geral, as células das culturas primárias morrem após um certo número de mitoses (50 a 100 mitoses). Mas, às vezes, algumas células sofrem mutação e se tornam imortais, isto é, multiplicam-se indefinidamente, constituindo as **culturas secundárias**. As células imortais formam as **linhagens celulares**, que não são constituídas de células inteiramente normais, pois sofreram alguma mutação. Todavia, elas conservam muitas características das células normais, sendo muito usadas em diversos experimentos.

As linhagens derivadas de células cancerosas apresentam certas particularidades. Por exemplo, elas crescem sem se prenderem à parede do frasco e multiplicam-se muito mais do que as células normais, atingindo uma densidade populacional maior.

Graças à dissociação, combinada com engenhosas técnicas de isolamento celular, foi possível a obtenção de cultivos de **clones** derivados de uma única célula. As células desses clones podem expressar muitas de suas especializações funcionais.

Os cultivos vêm sendo usados para estudos do metabolismo de células normais e cancerosas e, além disso, têm sido valiosos para experiências com vírus, que só se multiplicam no interior das células. Alguns protozoários foram estudados, também, em culturas de células por se desenvolverem no citoplasma.

Na citogenética, as culturas celulares são de grande utilidade, facilitando muito o estudo dos cromosomas de células vegetais e animais. A determinação de cariótipos humanos (estudo do número e morfologia dos cromosomas de uma pessoa) é geralmente feita em culturas de células do sangue.

Muitos tipos de células vegetais também podem ser mantidos em meios de cultura, onde elas crescem e se multiplicam, como o fazem as células animais. A separação das células dos vegetais exige procedimentos diferentes. Inicialmente, é necessário submeter as células à ação da enzima celulase, que digere a celulose, principal constituinte dessas paredes. A destruição das paredes libera as células envoltas apenas pela membrana plasmática e que, nesta condição, são denominadas **protoplastos**. Os protoplastos podem ser cultivados em meios de cultura adequados, de composição química definida, que possibilitam que eles cresçam e se dividam por mitoses. Quando as condições da cultura são adequadas, os protoplastos, depois de diversas divisões mitóticas, acabam formando pequenos agregados de células indiferenciadas. Esses agregados podem ser induzidos a originar plantas inteiramente novas. Essa propriedade das células vegetais cultivadas, de dar origem a um novo indivíduo completo (planta), é inexistente nas células animais.

As células vivas, animais e vegetais, podem ser submetidas a diversas técnicas de **microcirurgia** que utilizam instrumentos com extremidades de dimensões microscópicas. Entre esses instrumentos, geralmente feitos de vidro, estão agulhas de diversas formas, bisturis, pipetas e eletrodos. Através da microcirurgia, é possível a determinação do pH intracelular, o deslocamento e a remoção de organelas e vesículas, o transplante de partes de uma célula para outra e a remoção, por seccionamento, de fragmentos celulares. A microcirurgia é feita observando-se, no campo do microscópio, a célula e os instrumentos da microcirurgia, sendo estes manejados através de aparelhos especiais denominados **micromanipuladores**, que proporcionam movimentos muito precisos e delicados.

Sumário

Os conhecimentos sobre as células progridem à medida que as técnicas de investigação se aperfeiçoam. O aparecimento de um novo instrumento de trabalho, ou a aplicação mais engenhosa de um aparelho já existente, leva sempre a novas descobertas e à elucidação de algumas funções celulares. O estudo da célula começou com o microscópio óptico que, já em 1896, atingia grande eficiência graças às primeiras objetivas de grande resolução. O emprego deste aparelho em combinação com a desco-

berta de técnicas de microtomia e coloração permitiu o estudo morfológico das células com grandes detalhes. O microscópio óptico tem evoluído, com o microscópio de contraste de fase e o microscópio confocal.

Outro passo foi representado pela utilização sistemática de técnicas citoquímicas. Estas técnicas permitiram o conhecimento da composição química de muitos componentes celulares que antes eram estudados apenas do ponto de vista morfológico. O isolamento de organelas por centrifugação diferencial ou fracionada representou outro grande avanço, pois assim foi possível estudar, in vitro, *tanto a composição química precisa como também as funções das organelas.*

O advento do microscópio eletrônico e seu emprego para estudos morfológicos e citoquímicos representaram enorme impulso para o conhecimento das funções celulares. A influência do microscópio eletrônico foi tão grande que levou a uma revisão completa nos conceitos morfológicos dos constituintes celulares. Atualmente, a forma e a estrutura das organelas são geralmente descritas conforme aparecem no microscópio eletrônico.

O emprego conjunto das técnicas modernas, incluindo a radioautografia, a cultura de células em meios nutritivos definidos, o emprego do microscópio de fluorescência, do microscópio eletrônico de varredura, das técnicas de criofratura e das técnicas bioquímicas, veio ampliar de tal maneira o estudo das células, que se tornou usual designar essa nova abordagem sob a rubrica de Biologia Celular e Molecular.

Bibliografia

ALBERTS, B. *et al. Molecular Biology of the Cell*, 3rd ed. Garland Press, 1994.

ALLEN, R.D. New observations on cell architecture and dynamics by video-enhanced contrast optical microscopy. *Ann. Rev. Biophys. Chem., 14*:265, 1985.

BAKER, J.R.L. *Autoradiography: A Comprehensive Overview*. Oxford Univ. Press, 1989.

BENDAYAN, M. Protein A-gold electron microscopic immunocytochemistry; Methods, applications and limitations. *J.Electron Microsc. Techn. 1*:243, 1984.

CUELLO, A.C.C. *Immunocytochemistry*. John Wiley, 1983.

DARNELL, J.E., LODISH, H.F. and BALTIMORE, D. *Molecular Cell Biology*. 2nd ed. Freeman, 1990.

EVERHART, T.E., and HAYES, T.L. The scanning electron microscope. *Sci. Am., 226*:54, Jan. 1972.

FRESHNEY, R.I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. Liss Pub., 1987.

GLAUERT, A.M. (ed.). *Practical Methods in Electron Microscopy*. North-Holland/American Elsevier, 1980.

GOLDSTEIN, J.I. *et al. Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. Plenum, 1981.

GRIMSTONE, A.V. *O Microscópio Eletrônico em Biologia*. Editora da Univ. de S. Paulo, 1980.

JAMES, J. *Light Microscopic Techniques in Biology and Medicine*. Martinus Nijhoff, 1976.

PEARSE, A.G.E. *Histochemistry, Theoretical and Applied*. 4th ed. Churchill Livingstone, 1980.

ROGERS, A.W. *Techniques of Autoradiography*. 3rd ed. Elsevier, 1979.

SALPETER, M.M. and BACHMANN, L. Assessment of technical steps in electron microscope autoradiography. *In*: C.P. Leblond and K.B. Warren (eds.). *The Use of Radioautography in Investigating Protein Synthesis*. Acad. Press, 1965.

SPENCER, M. *Fundamentals of Light Microscopy*. Cambridge University Press, 1982.

WISCHNITZER, S. *Introduction to Electron Microscopy*. Pergamon Press, 1981.

3

Bases Macromoleculares da Constituição Celular

Roteiro

- *A estrutura e o funcionamento das células dependem de macromoléculas formadas pela polimerização de monômeros.*
- *A molécula da água é um dipolo com características especiais que a tornam indispensável à vida.*
- *As proteínas são polímeros de 20 aminoácidos diferentes.*
- *A estrutura das moléculas das proteínas apresenta 4 níveis de organização: primário, secundário, terciário e quaternário.*
- *O metabolismo celular deve-se à atividade das enzimas.*
- *Pela ação do frio, pode-se baixar ou parar, temporariamente, a ação das enzimas.*
- *Agrupadas em seqüência, muitas vezes presas a membranas, as enzimas atuam de modo mais eficiente.*
- *Isoenzimas são moléculas ligeiramente diferentes que atuam sobre o mesmo substrato, porém com velocidades diferentes.*
- *Os ácidos nucléicos (DNA e RNA) são polímeros de nucleotídeos.*
- *Há três tipos de RNA, com funções diferentes: RNA de transferência, RNA mensageiro e RNA ribosômico.*
- *O RNA pode ter ação enzimática.*
- *A hibridização molecular permite caracterizar bem as moléculas de RNA e de DNA.*
- *Os lipídios são componentes importantes das membranas celulares e formam reservas nutritivas.*
- *Os polissacarídeos estão presentes principalmente nas reservas energéticas (glicogênio, amido), nas glicoproteínas e nas glicosaminoglicanas.*

As moléculas que constituem as células são formadas pelos mesmos átomos encontrados nos seres inanimados. Todavia, na origem e evolução das células, alguns tipos de átomos foram selecionados para a constituição das biomoléculas. Noventa e nove por cento da massa das células são formados de **hidrogênio, carbono, oxigênio** e **nitrogênio,** enquanto, nos seres inanimados da crosta terrestre, os quatro elementos mais abundantes são **oxigênio, silício, alumínio** e **sódio.** Excluindo-se a água, existe nas células predominância absoluta dos compostos de carbono, extremamente raros na crosta da Terra. Portanto, a primeira célula e as que dela evoluíram selecionaram os compostos de carbono (compostos orgânicos), cujas propriedades químicas são mais adequadas à vida.

As células são constituídas de macromoléculas poliméricas

É característica da matéria viva a presença de moléculas de alto peso, ou **macromoléculas**, que são **polímeros** constituídos pela repetição de unidades menores, chamadas **monômeros.** Os polímeros formados por monômeros semelhantes são chamados de **homopolímeros.** É o caso do glicogênio, que é constituído exclusivamente por moléculas de glicose. Os **heteropolímeros** são constituídos por monômeros diferentes. Os ácidos nucléicos, por exemplo, são heteropolímeros.

As macromoléculas existem nas células com grande diversidade não só quanto ao seu tamanho, mas, principalmente, quanto à variedade dos seus monômeros constituintes. Os polímeros encontrados nos seres vivos (**biopolímeros**) serão aqui estudados quanto à sua constituição e quanto à importância biológica dos processos de interação destas macromoléculas. Os biopolímeros de maior importância são as proteínas, constituídas por aminoácidos; os polissacarídeos, que são polímeros de monossacarídeos; e os ácidos nucléicos (DNA e RNA), formados por nucleotídeos.

Além dos polímeros, moléculas menores como lipídios, água, sais minerais e vitaminas têm relevante papel na constituição e funcionamento das células.

A diversidade estrutural e funcional de um polímero depende da variedade de seus monômeros. Na constituição das proteínas participam 20 aminoácidos diferentes, enquanto os ácidos nucléicos são formados por apenas cinco tipos de nucleotídeos (monômeros). Por isso, as proteínas têm maior polimorfismo e, conseqüentemente, maior diversidade funcional do que os ácidos nucléicos.

Freqüentemente, macromoléculas de diferentes tipos se associam para formar complexos como as lipoproteínas, glicoproteínas e proteoglicanas (proteínas combinadas com polissacarídeos) e as nucleoproteínas (ácidos nucléicos mais proteínas).

A molécula da água é assimétrica

Conforme foi visto no Cap. 1, as primeiras células surgiram na massa líquida que cobria a maior parte da superfície terrestre há bilhões de anos. Provavelmente ao acaso e a partir de moléculas orgânicas originadas antes da existência de qualquer ser vivo (origem pré-biótica), formaram-se micelas que evoluíram pelo aparecimento de uma membrana, originando-se assim as primeiras células. De tal modo a origem das células está associada à água, que esta é a molécula mais abundante em todas as células, sem qualquer exceção. As moléculas de proteínas, lipídios e polissacarídeos variam de uma célula para outra, mas todas as células contêm água. Este composto não é uma molécula inerte, com a única função de preencher espaços; ao contrário, a água e seus íons influem poderosamente na configuração e propriedades biológicas das macromoléculas.

A molécula de água é morfológica e eletricamente **assimétrica.** Os dois átomos de hidrogênio formam com o de oxigênio um ângulo que, em média, é estimado em 104,9°. Portanto, apesar de ser representada pela fórmula H-O-H, a molécula de água não é um bastão reto. Por outro lado, devido à forte atração exercida pelo núcleo do oxigênio sobre os elétrons, esta molécula é relativamente positiva, no lado dos dois hidrogênios, e negativa no lado do oxigênio, isto é, a molécula de água é um **dipolo.** No espaço, devido à forma das órbitas do hidrogênio e oxigênio, as cargas elétricas estão distribuídas de tal forma que o oxigênio ocupa o centro e os hidrogênios (relativamente positivos) ocupam os dois extremos de um tetraedro, conforme mostra a Fig. 3.1.

Por sua natureza dipolar, a água é um dos melhores solventes conhecidos. Ela dissolve muitas substâncias cristalinas e outros

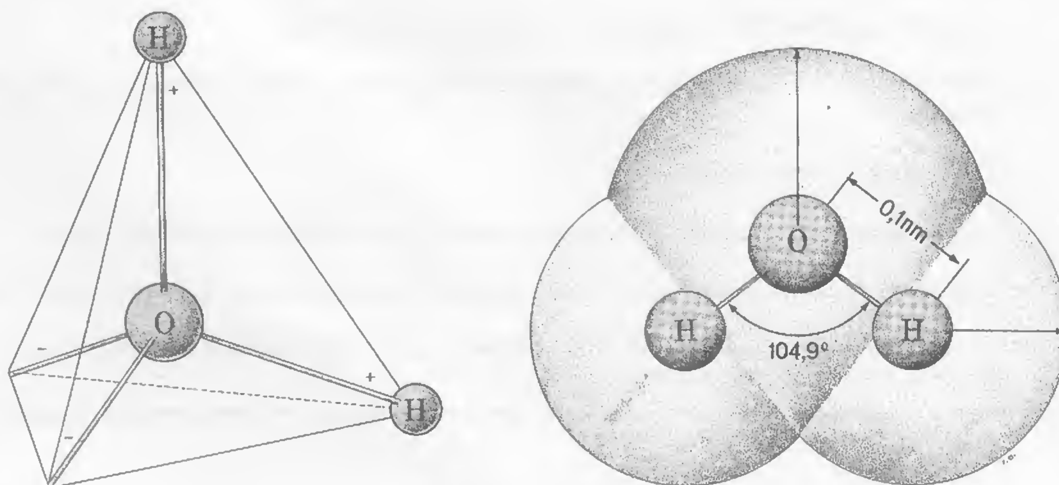


Fig. 3.1 À **esquerda**, esquema do dipolo da água; à **direita**, a forma tridimensional de sua molécula.

compostos iônicos porque sua tendência a se combinar com íons negativos ou positivos é, freqüentemente, maior que a tendência de os íons se combinarem entre si. Por exemplo, os cristais de NaCl dissolvem-se com facilidade em água porque, apesar da atração eletrostática entre o Cl^- e o Na^+ do cristal, cada um destes íons é atraído ainda mais fortemente pelo dipolo da água. Assim, o cristal se rompe, formando-se os íons hidratados de Cl^- e Na^+, altamente estáveis.

O grau de afinidade pela água tem relevante papel nas propriedades biológicas das macromoléculas

Os polímeros celulares contêm em sua estrutura grupamentos químicos que apresentam afinidade pela água (**grupamentos polares**) ou que não apresentam afinidade pela água (**grupamentos apolares**), repelindo-a. Os grupamentos polares principais são carboxila, hidroxila, aldeído, sulfato e fosfato. Moléculas com alto teor de grupamentos polares são francamente solúveis na água e são chamadas de **hidrofílicas** (*hidro*, água, e *filos*, amigo). A maioria dos hidratos de carbono, os ácidos nucléicos e muitas proteínas são hidrofílicas. Em contraposição existem moléculas sem ou com poucos grupamentos polares e que, conseqüentemente, são insolúveis na água. São as moléculas **hidrofóbicas** (*hidro*, água, e *fobos*, aversão). Como exemplo, podem ser citados os lipídios, a parafina e os óleos. Estas moléculas são repelidas pela água.

Existem também macromoléculas, geralmente alongadas, que apresentam uma região hidrofílica e outra hidrofóbica. São as moléculas chamadas **anfipáticas**, dotadas da capacidade de associar-se simultaneamente a água e a compostos hidrofílicos por uma de suas extremidades, e a compostos hidrofóbicos, pela outra extremidade. As moléculas anfipáticas exercem importantes funções biológicas e estão presentes em todas as membranas celulares.

A análise das forças responsáveis pela coesão dos monômeros nos biopolímeros demonstrou que existem dois tipos gerais de forças que podem ser agrupadas de acordo com a sua intensidade. Esta intensidade, por sua vez, pode ser avaliada pela energia necessária para se realizarem ou se desfazerem estas uniões (Tabela 3.1). De um lado estão as **ligações fortes**, chamadas **covalentes**. São resultantes da superposição das órbitas externas das moléculas e são uniões fortes e estáveis que consomem altas quantidades de energia para sua realização. É o tipo de união que se observa nas ligações peptídicas entre os aminoácidos e que só podem ser desfeitas

Tabela 3.1 Energia despendida para romper algumas ligações moleculares de interesse biológico

Tipo de ligação		Energia (kcal/mol)
Ligações covalentes (fortes)	$H_3C—CH_3$	88 (simples)
	C=O	170 (dupla)
	N≡N	226 (tripla)
Ligações não-covalentes (fracas)	- ponte de H	5
	- ligação iônica	5
	- interação hidrofóbica	1-3

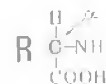


Fig. 3.2 Fórmula geral dos alfa-aminoácidos.

por procedimentos drásticos como a hidrólise em ácido forte a alta temperatura. Estas ligações necessitam ao redor de 100 kcal por mol para se formarem. Do outro lado, estão as **ligações fracas**, de natureza variada, que se formam com pequeno gasto energético e podem ser desfeitas por procedimentos suaves como aquecimento moderado e alteração da concentração iônica do meio. As principais ligações fracas são: as **pontes de hidrogênio**, as **ligações eletrostáticas** e as **interações hidrofóbicas**. As **pontes de hidrogênio** ocorrem devido ao uso em comum de um átomo de hidrogênio por radicais diferentes. No caso das proteínas, isto tem lugar entre o nitrogênio e a carbonila de ligações peptídicas diferentes (Fig. 3.6). As pontes de hidrogênio são também importantes na ligação entre as duas cadeias do DNA, ligação esta que ocorre devido a pontes que se estabelecem entre duas bases (Fig. 3.19). As **ligações eletrostáticas** são ligações que se formam quando um grupo ácido se prende a um básico. São exemplos a ligação entre aminoácidos básicos e ácidos, entre corantes ácidos (geralmente com grupos sulfônicos: SO_3^-) e proteínas básicas dos tecidos ou, então, entre as glicosaminoglicanas (que contêm grupamentos sulfato: SO_4^{2-}) e proteínas básicas. As **interações hidrofóbicas** ocorrem entre moléculas apolares que são comprimidas umas contra as outras devido à repulsão que sofrem da água que as envolve. Não é, portanto, propriamente uma **ligação**, como ocorre nas pontes de hidrogênio ou ligação eletrostática, sendo mais adequadamente definida como uma **interação**. O exemplo mais importante de interação hidrofóbica em biologia tem lugar nas membranas da célula (v. Cap. 5), onde as duas camadas de lipídios associam-se principalmente devido a este tipo de interação.

A importância biológica destas interações e ligações de baixa energia reside no fato de que elas permitem à célula alterar, montar e desmontar estruturas supramoleculares como, por exemplo, os microtúbulos e microfilamentos, aumentando assim, enormemente, a sua versatilidade e eficiência funcional sem grande gasto energético. Se as interações das macromoléculas fossem realizadas apenas com ligações fortes, a estrutura celular seria estável, e as modificações desta estrutura implicariam um gasto de energia tão alto que a atividade celular seria impossível.

Proteínas são polímeros de aminoácidos

As proteínas são macromoléculas contendo um número variável de L-aminoácidos, unidos por ligações peptídicas (Figs. 3.2 e 3.3). São, portanto, polímeros de aminoácidos. As cadeias as-

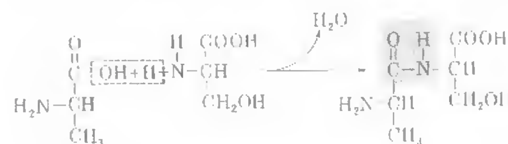


Fig. 3.3 Formação da ligação peptídica, indicada em sombreado, pela união de dois aminoácidos e formação de uma molécula de água.

sim constituídas chamam-se cadeias polipeptídicas e, ao atingirem certa dimensão, recebem o nome de proteína. É comum considerar proteínas os polipeptídeos com peso molecular a partir de 6.000 dáltons.

Embora existam mais de 150 aminoácidos, só 20 são encontrados nas proteínas (Fig. 3.4). Estes 20 aminoácidos celulares são todos de estrutura L, o que reforça a hipótese, apresentada no Cap. 1, segundo a qual todas as células hoje existentes derivam de uma célula ancestral única. A célula ancestral teria aproveitado os L-aminoácidos, sendo a capacidade de utilizá-los transmitida a todas as células descendentes.

Os aminoácidos encontrados nas proteínas possuem em comum a presença de um grupo NH_2 (amino) e um grupo COOH (carboxila) ligados ao carbono alfa da molécula (Figs. 3.2 e 3.3). Fazem exceção a prolina e a hidroxiprolina, que contêm o grupo NH (imino) em substituição ao grupo NH_2. Na realidade, a prolina e a hidroxiprolina são iminoácidos (Fig. 3.4), mas se incluem entre os aminoácidos por apresentarem propriedades semelhantes a estes.

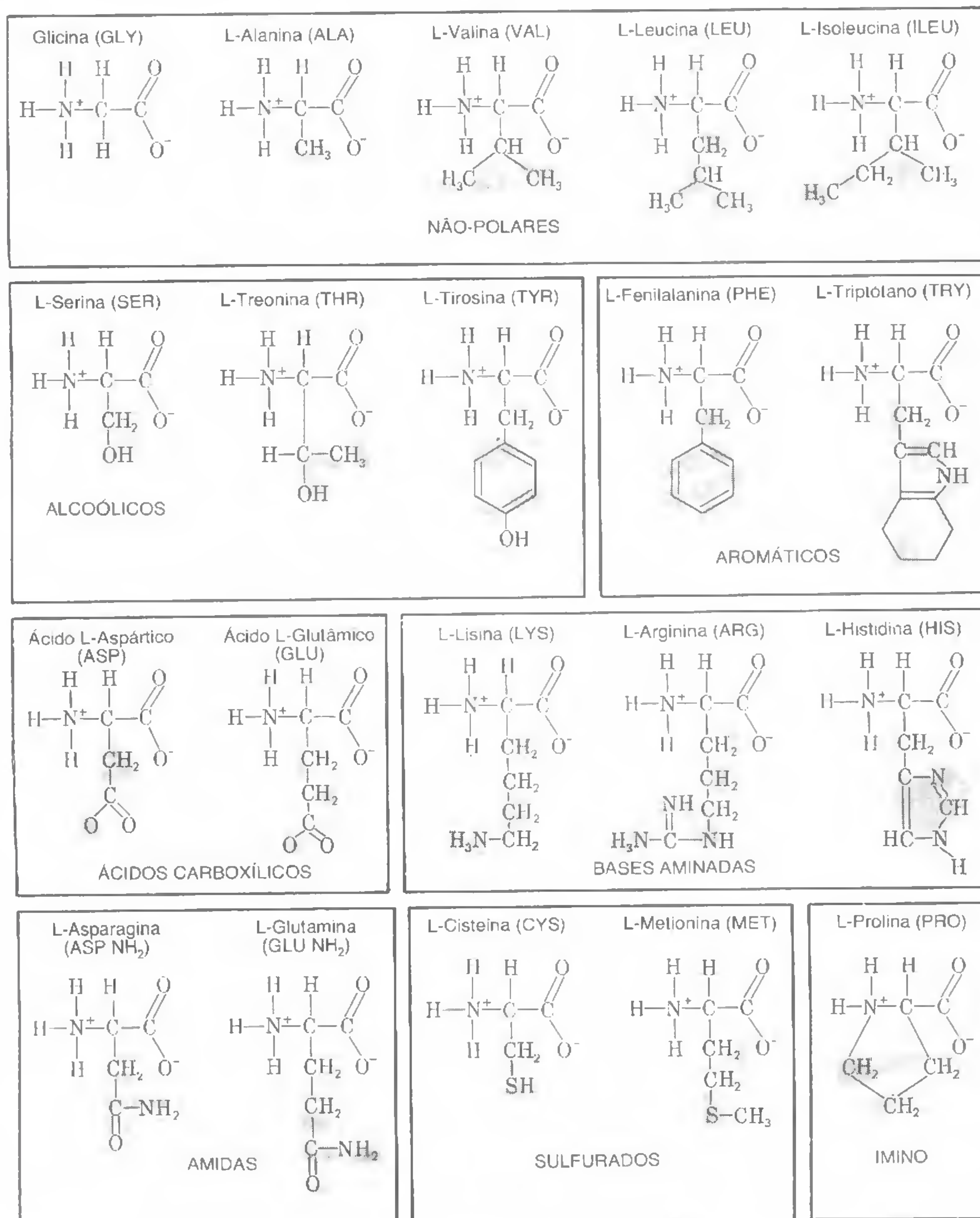


Fig. 3.4 Moléculas dos 20 aminoácidos encontrados nas proteínas. As cadeias laterais, responsáveis por certas propriedades químicas dos aminoácidos, estão indicadas pelo sombreado.

As proteínas podem ser classificadas em duas categorias. As **proteínas simples**, cujas moléculas são formadas exclusivamente por aminoácidos e as **proteínas conjugadas**, que se caracterizam pela presença, em suas moléculas, de uma parte não-protéica denominada **grupo prostético**. Entre as proteínas conjugadas podem ser mencionados os seguintes exemplos: **nucleoproteínas**, com grupo prostético constituído por ácidos nucléicos; **glicoproteínas**, que contêm polissacarídeos; **lipoproteínas**, que contêm lipídios; **fosfoproteínas**, cujo grupo prostético contém fósforo; **hemeproteínas** (catalases, peroxidases e citocromos) contendo o grupo heme, que é uma ferroporfirina; **flavoproteínas** contendo riboflavina no grupo prostético; e, finalmente, **metaloproteínas**, nas quais o grupo prostético ou é um metal (insulina e anidrase carbônica, que contêm zinco), ou é um composto inorgânico contendo metal, como, por exemplo, a ferritina, cujo grupo prostético é o $Fe(OH)_3$.

Os grupamentos NH_2 e COOH são ionizáveis, o que confere carga elétrica às proteínas e condiciona a sua migração em um campo elétrico. Conforme haja predominância de grupos NH_2 ou COOH, as proteínas são básicas ou ácidas, respectivamente. Por exemplo, as histonas, ricas em lisina e arginina (aminoácidos com dois grupos NH_2 por molécula), são eletricamente positivas em pH 7, portanto, básicas e, por isso, combinam-se com os grupos fosfato do ácido desoxirribonucléico (DNA) para formar nucleoproteínas.

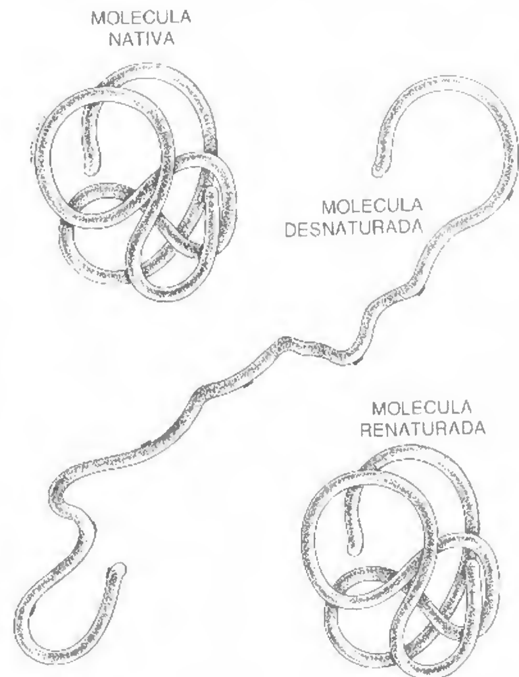


Fig. 3.5 Em cima, à esquerda, aparece uma molécula protéica globosa, em sua configuração nativa. **No centro**, a mesma molécula, porém desnaturada. Como a desnaturação é freqüentemente reversível, a molécula pode voltar à sua forma inicial, como mostra a figura **embaixo, à direita**. As pequenas faixas negras representam os radicais que se unem para estabelecer a configuração nativa da proteína.

A forma e o papel biológico das moléculas protéicas dependem principalmente da seqüência de aminoácidos

A forma tridimensional da molécula de uma proteína depende sobretudo da seqüência de aminoácidos e do número de cadeias polipeptídicas que constituem sua molécula. Há proteínas cuja molécula tem apenas uma cadeia polipeptídica, enquanto outras possuem múltiplas cadeias, em geral umas diferentes das outras. Por exemplo, a hemoglobina é constituída por duas cadeias alfa (iguais entre si) e duas cadeias beta (também iguais entre si).

Do ponto de vista biológico, o conhecimento da forma tridimensional das moléculas protéicas em estado nativo (configuração nativa) é muito importante, pois é assim que, dentro da célula, as moléculas interagem umas com as outras. Chama-se **configuração nativa** à forma tridimensional que uma molécula apresenta nas condições de pH e temperatura existentes nos organismos vivos (Fig. 3.5).

A estrutura das moléculas protéicas é mantida pelas seguintes forças de estabilização:

1) **ligação peptídica**, já explicada, que é resultante de ligação covalente;
2) **interação hidrofóbica**;
3) **pontes de hidrogênio**;
4) **ligações dissulfeto** ou S—S, que são ligações covalentes entre moléculas do aminoácido cisteína.

O número e a seqüência dos resíduos aminoácidos em uma cadeia polipeptídica determinam a **estrutura primária** da proteína. A estrutura primária é mantida por ligações peptídicas, mas, se estas fossem as únicas ligações existentes, as moléculas das proteínas seriam dobradas ao acaso, irregularmente.

Entretanto, o estudo das propriedades das moléculas protéicas em estado nativo revela que elas são constituídas por cadeias polipeptídicas dobradas de forma bastante regular e constante para cada tipo de proteína.

As cadeias se dobram e se enrolam de modo complexo, para constituírem um arranjo espacial definido e típico da proteína conhecido como sua **estrutura secundária**. Uma estrutura secundária muito freqüente entre as proteínas globulares que formam a maioria das proteínas da célula é a **alfa-hélice** (Fig. 3.6). Esta configuração se deve à formação de pontes de hidrogênio entre aminoácidos de uma mesma cadeia, a qual adquire a forma de saca-rolha ou hélice.

A cadeia contendo a estrutura secundária dobra-se novamente sobre si mesma, formando estruturas globosas ou alongadas, adquirindo assim uma **estrutura terciária** (Fig. 3.7).

Muitas proteínas têm moléculas constituídas por várias cadeias peptídicas, que podem ser iguais ou diferentes. Estas cadeias chamam-se **subunidades** ou **monômeros**. O modo específico de as subunidades se juntarem para formar a molécula protéica tem o nome de **estrutura quaternária** da proteína (Fig. 3.8). Esta estrutura é mantida graças à cooperação de numerosas ligações químicas fracas, como as pontes de hidrogênio. Através da organização protéica quaternária, formam-se diversas estruturas de grande importância biológica, como os microtúbulos, microfilamentos, capsômeros dos vírus e os complexos enzimáticos que serão descritos adiante, neste mesmo capítulo. Também as fibrilas colágenas (Fig. 3.9) encontradas no espaço extracelular do tecido conjuntivo são constituídas pela agregação de cadeias polipeptídicas de tropocolágeno.

Diz-se que uma proteína é **globular** quando a sua molécula tem uma relação comprimento-largura menor do que 10:1. A grande maioria das proteínas das células é globular, como a hemoglobina, a mioglobina, a hemocianina, as proteínas com ati-

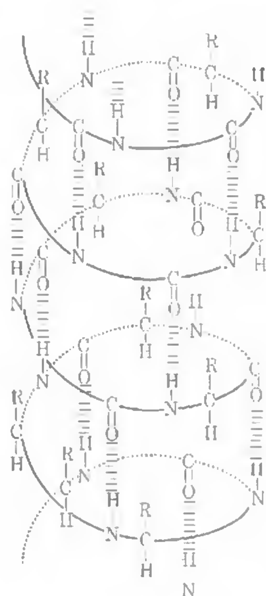


Fig. 3.6 Estrutura secundária (alfa-hélice) de uma proteína. As pontes de hidrogênio entre os aminoácidos estão representadas por traços paralelos

vidade enzimática e as proteínas das membranas celulares. Quando a relação comprimento-largura é maior que 10:1, a proteína é dita **fibrosa**.

Dentre as proteínas fibrosas intracelulares, a **queratina** é a mais bem estudada (Fig. 3.10). A proteína mais abundante no corpo dos mamíferos é o **colágeno**, proteína fibrosa extracelular que constitui as fibrilas colágenas já mencionadas.

Pelo que foi explicado sobre a estrutura das proteínas em nível primário, secundário, terciário e quaternário, pode-se concluir que a organização estrutural dessas moléculas depende exclusivamente da seqüência de aminoácidos, isto é, da estrutura primária. Uma vez sintetizada pela célula, uma molécula protéica com determinada seqüência de aminoácidos (estrutura primária), automaticamente e sem gasto de energia, assumirá sua estrutura secundária, terciária e quaternária, como conseqüência da própria disposição dos aminoácidos ao longo da molécula.

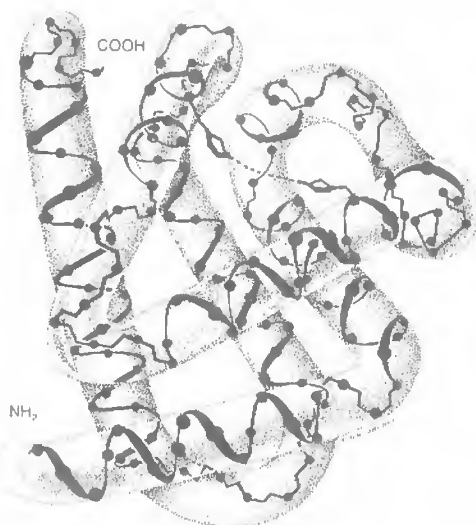


Fig. 3.7 Desenho esquematizando as estruturas primária, secundária e terciária de uma proteína. Na fita negra estão representados os resíduos aminoácidos (estrutura primária) e a hélice formada por eles (estrutura secundária). As dobras da molécula, demonstradas por seu contorno externo, em pontilhado fino, constituem a estrutura terciária.

Através das enzimas, os genes controlam o metabolismo celular

As enzimas são moléculas protéicas dotadas da propriedade de acelerar intensamente determinadas reações químicas, tanto no sentido da síntese como no da degradação de moléculas. São elas as principais responsáveis pela eficiência da maquinaria química intracelular. Graças às enzimas, as células executam, em milésimos de segundo, a síntese de moléculas que, *in vitro*, sem enzimas, necessitariam de semanas de trabalho para serem sintetizadas. Além da rapidez, as sínteses enzimáticas apresentam alto rendimento, isto é, no final da reação gera-se apenas o produto desejado ou alguns produtos, mas todos úteis às células. Ao contrário, nas sínteses de laboratório, não-enzimáticas, formam-se, além das moléculas desejadas, numerosos subprodutos, originando-se assim uma mistura da qual a molécula desejada deve ser separada. Se isto acontecesse no meio intracelular, haveria uma concentração de produtos indesejáveis que perturbaria o metabolismo.

Sendo catalisadores tão eficientes, as enzimas têm sido usadas para síntese *in vitro*, tanto no laboratório experimental como na produção industrial.

As enzimas são proteínas e, como tais, produzidas sob o controle do DNA. Elas são os efetores da informação genética contida no DNA, e é através delas que o DNA comanda todo o metabolismo celular. Embora praticamente todas as moléculas enzimáticas sejam proteínas, há alguns RNAs que possuem atividade enzimática, constituindo uma exceção à regra geral.

Ação enzimática. O composto que sofre a ação de uma enzima chama-se **substrato**. A molécula da enzima possui um ou mais **centros ativos**, aos quais o substrato se combina para que seja exercida a ação enzimática. A forma tridimensional da enzima é importante para a sua atividade, pois os centros ativos são regiões cuja conformação tridimensional é complementar da molécula do substrato. Esta estereocomplementaridade é essencial para que se verifique o encaixe tridimensional preciso entre a enzima e seus substratos (Fig. 3.11); é através deste encaixe que a enzima reconhece seus substratos e se prende com maior ou menor intensidade (afinidade) a eles.

A especificidade das enzimas é muito variável. Algumas atuam exclusivamente sobre um tipo de molécula, não atacando sequer seu estereoisômero. Por exemplo, a desidrogenase láctica é específica para o L-lactato, e a D-aminoácido-oxidase só ataca os D-aminoácidos. Por outro lado, há enzimas que atuam sobre vários compostos com alguma característica estrutural comum. É o caso, por exemplo, das fosfatases, que hidrolisam diversos ésteres do ácido fosfórico.

Para exercerem sua atividade, muitas enzimas necessitam de **co-fatores**, que podem ser um íon metálico ou uma molécula. Quando o co-fator é uma molécula, recebe o nome de **coenzima**. Ao contrário da própria enzima, que, sendo proteína, é desnaturada e inativada por temperaturas muito elevadas, em geral as coenzimas são termoestáveis.

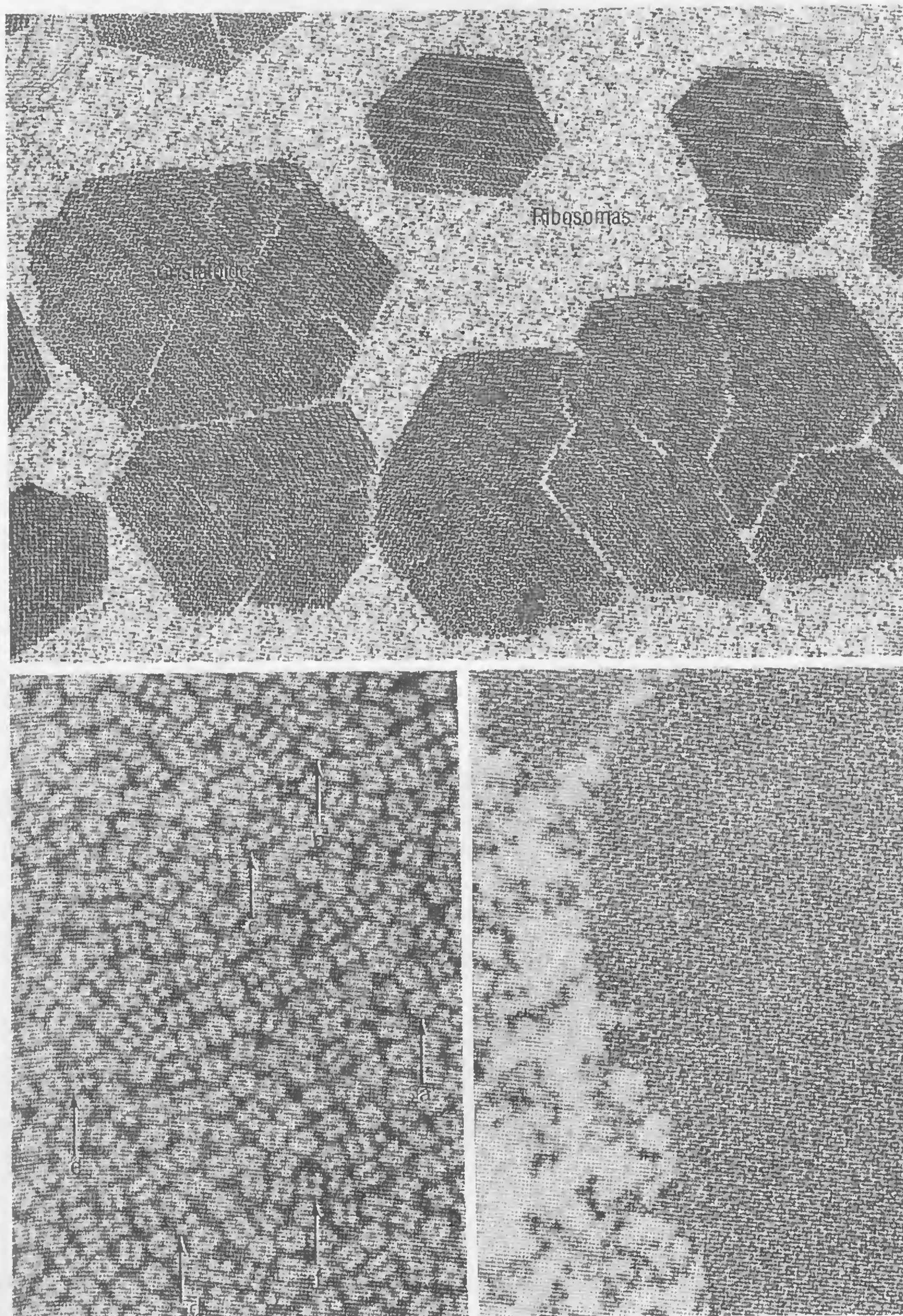


Fig. 3.8 Estas eletromicrografias mostram um exemplo da estrutura quaternária de uma proteína, a hemocianina, presente no sangue de *Limulus polyphemus*. **Em cima**, corte da célula produtora de hemocianina, cujas moléculas se agrupam formando cristalóides (43.000 ×). **Embaixo, à direita**, com maior aumento (80.000 ×) as moléculas componentes dos cristalóides (hemocianina) são visíveis. **À esquerda**, com aumento ainda maior (210.000 ×) observa-se claramente que a molécula de hemocianina é um tetrâmero que aparece com aspectos diferentes conforme a posição em que é observado (*a* e *b*). Sua subunidade ou monômero está indicada em *c*. Observar ainda dímeros (*d*) e os tetrâmeros com seus quatro monômeros globulares bem visíveis (*e* e *f*). (Micrografias de W.H. Fahrenbach, *Journal of Cell Biology*, 44:445, 1970. Reprodução autorizada.)

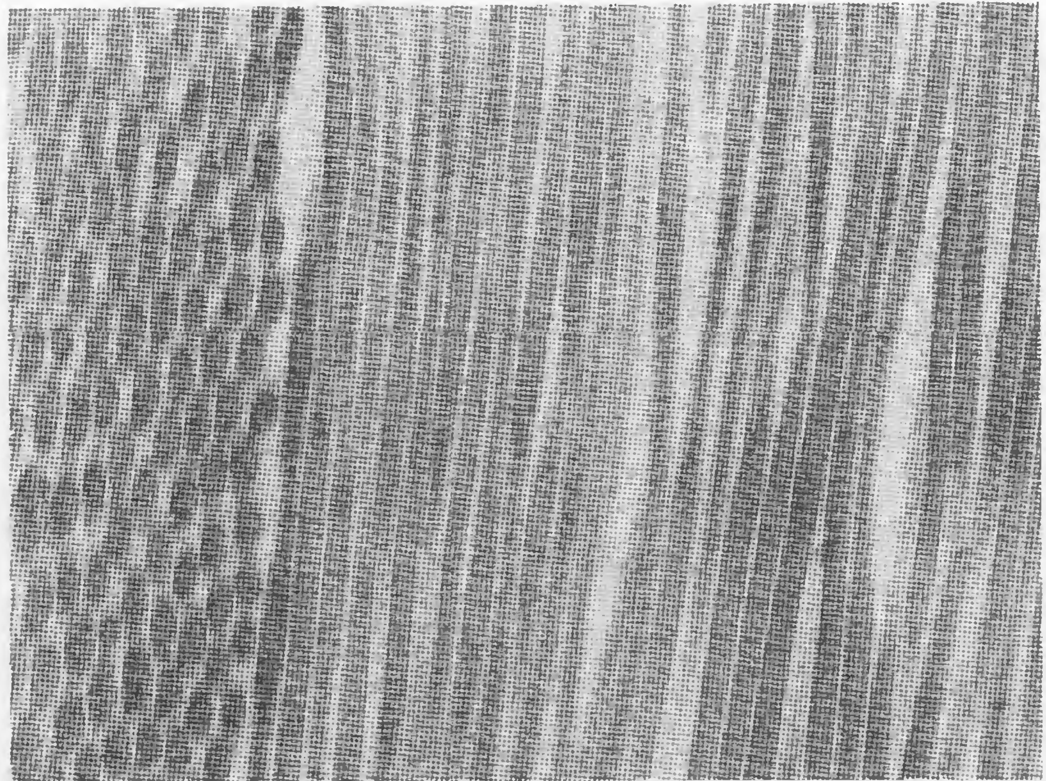


Fig. 3.9 Eletromicrografia do tecido conjuntivo da pele humana. As estruturas alongadas são fibrilas colágenas constituídas pela agregação de moléculas de tropocolágeno (proteína fibrosa). As fibrilas são estruturas protéicas quaternárias cujo monômero é o tropocolágeno. À esquerda, cortes oblíquos destas fibrilas. Aumento: 33.000 ×.

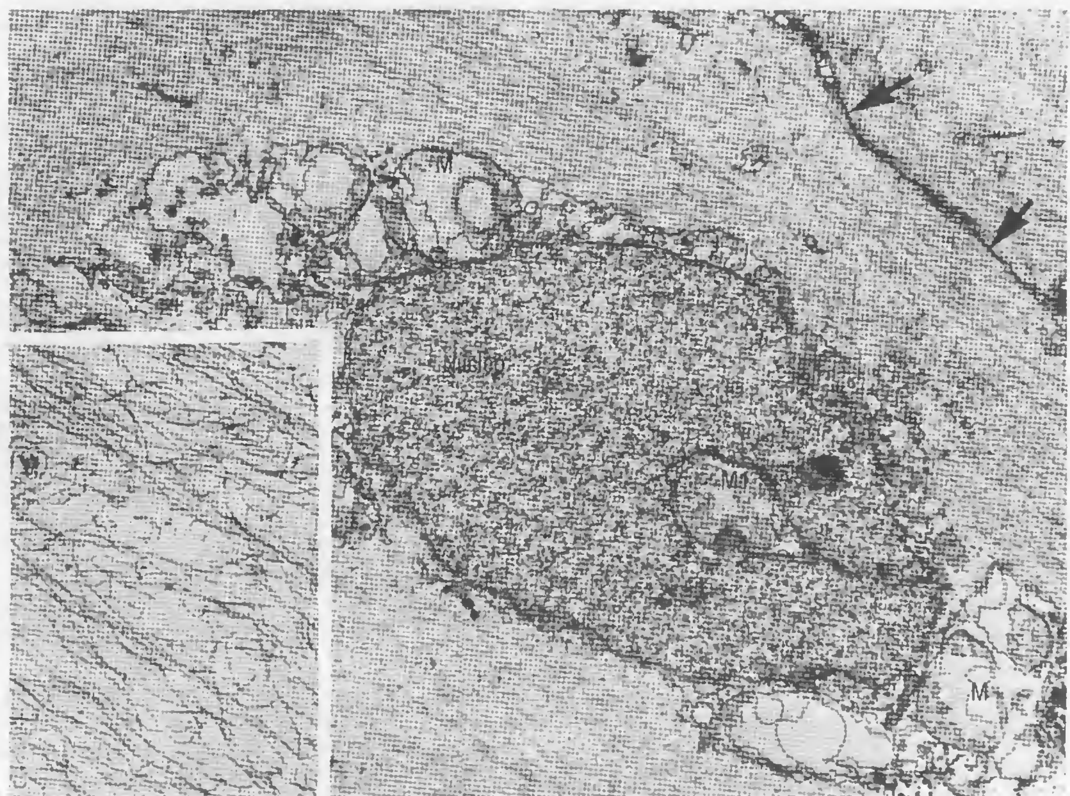


Fig. 3.10 Eletromicrografia de célula epidérmica de peixe. As setas indicam o limite entre duas células. Observar os numerosos filamentos de queratina (proteína fibrosa). *M*, mitocôndria. *M1*, mitocôndria em dobra (invaginação) do envoltório nuclear. Aumento: 10.000 ×. A micrografia menor, à esquerda, mostra os filamentos de queratina aumentados 200.000 vezes.

Tabela 3.2 Principais classes de enzimas segundo a Nomenclatura da Comissão de Enzimas, União Internacional de Bioquímica. Na classificação completa, cada classe deste quadro é subdividida

Classe	Nome	Catalisam	Exemplos
1	Oxidorredutases	Reações nas quais um composto é reduzido e outro oxidado	Desidrogenases, oxidases, peroxidases
2	Transferases	Transferência de grupamentos químicos de uma molécula para outra	Transaminases, transmetilases
3	Hidrolases	Rompimento de moléculas com adição de água	Peptidases, fosfatases, esterases
4	Liases	Remoção de um grupo químico, originando uma dupla ligação no substrato; ou adição de um grupo a uma dupla ligação que é assim desfeita	Descarboxilases, desaminases
5	Isomerases	Rearranjos intramoleculares que modificam a estrutura tridimensional do substrato	Racemases, epimerases
6	Ligases	União de duas moléculas, com hidrólise de ATP ou outro composto rico em energia	Acetil-coenzima A sintetase, carboxilase do piruvato

Alguns co-fatores estão ligados de modo permanente e íntimo à molécula da enzima, enquanto outros a ela se unem temporariamente, durante a ação enzimática. O complexo formado pela enzima com o co-fator, independentemente do grau de união química entre eles, chama-se **holoenzima**. Removendo-se o co-fator, resta a parte protéica da enzima, que é então inativa e se chama **apoenzima**.

Quando o co-fator está fortemente ligado à molécula da apoenzima, ele constitui um grupo prostético e a enzima deve ser considerada uma proteína conjugada.

A parte ativa de muitas coenzimas contém vitaminas do grupo B, como riboflavina, tiamina, ácido pantotênico e nicotinamida.

Nomenclatura. Muitas enzimas são designadas pelo nome do substrato sobre o qual atuam mais o sufixo **-ase**. Por exemplo, o **ácido ribonucléico** (substrato) é hidrolisado por uma enzima que recebeu o nome de **ribonuclease**. Outras enzimas, porém — inclusive algumas dentre as mais bem-estudadas —, são conhecidas por nomes que não seguem esta regra. São exemplos a **pepsina** e a **tripsina**, que hidrolisam proteínas.

A Comissão de Enzima da União Internacional de Bioquímica adotou uma classificação das enzimas em seis categorias principais (Tabela 3.2), cada uma com subdivisões, e estabeleceu normas para a designação mais precisa e informativa de cada enzima. Por exemplo, pela nomenclatura da Comissão, a enzima em geral chamada hexoquinase e que catalisa a reação ATP + glicose → glicose-6-fosfato + ADP deve ser chamada ATP: **hexose-fosfotransferase**. Esta última denominação indica mais precisamente a ação da enzima, que é transferir um grupo fosfato do ATP para uma hexose (Fig. 3.11). Todavia, a nomenclatura internacional é pouco usada na prática, porque as enzimas recebem designações muito longas, em comparação com seus nomes corriqueiros.

A atividade enzimática é muito sensível à ação de diversos fatores

A atividade das enzimas, muito sensível a diversos agentes químicos e físicos, é capaz de ser inibida de várias maneiras. A inibição pode ser **competitiva** ou **não-competitiva**.

Entre os fatores que afetam a atividade enzimática, chamam a atenção a temperatura, concentração do substrato e presença de ativadores ou inibidores que alteram a velocidade de atuação das enzimas.

O efeito da temperatura tem grande importância prática, uma vez que o frio deprime a atividade enzimática, retardando os processos de lise celular e a deterioração de amostras de tecidos, sangue, urina etc. utilizadas em exames de laboratório. No transplante de órgãos, é comum o uso de temperaturas baixas para melhor preservação dos tecidos a serem transplantados.

Temperaturas muito baixas obtidas geralmente com o uso de nitrogênio líquido (ponto de ebulição −195,8°C) são utilizadas de rotina na preservação de culturas de tecidos, amostras de tecidos para posterior análise bioquímica, sementes de plantas, espermatozóides para inseminação artificial e embriões para transplante.

1. Inibição competitiva. Quando uma substância resistente à ação enzimática, porém de molécula muito parecida com a do substrato da enzima, se fixa nos centros ativos da molécula enzimática, diz-se que a inibição é **competitiva**. Nesse caso, o inibidor compete com o substrato para se localizar no centro ativo, e o grau de inibição é influenciado pela concentração do substrato. Quanto maior a concentração do substrato, menor será a probabilidade de o inibidor chocar-se com as moléculas da enzima e ocupar seus centros ativos.

2. Inibição não-competitiva. Este tipo de inibição não é afetado pela concentração do substrato, dependendo exclusivamente da concentração do inibidor. O caso mais freqüente de inibição não-competitiva é representado pela combinação reversível de metais pesados com os grupos —SH da molécula enzimática. Isto altera a forma tridimensional da molécula da enzima e impede sua atividade. Ocorre também inibição não-competitiva quando a enzima precisa de certos íons e estes são removidos da solução. Por exemplo, as enzimas que necessitam de Mg^{2+} são inibidas pelo EDTA (etilenodiaminotetracetato de sódio), pois este composto forma um complexo com cátions divalentes e, desse modo, remove o Mg^{2+} da solução. A inibição é reversível pela adição de cátions Mg^{2+}.

Para aumentar sua eficiência, as enzimas se agrupam em complexos ou se prendem a membranas

Na célula viva, a maioria das enzimas funciona em seqüência, de modo que o produto resultante da ação de uma enzima é

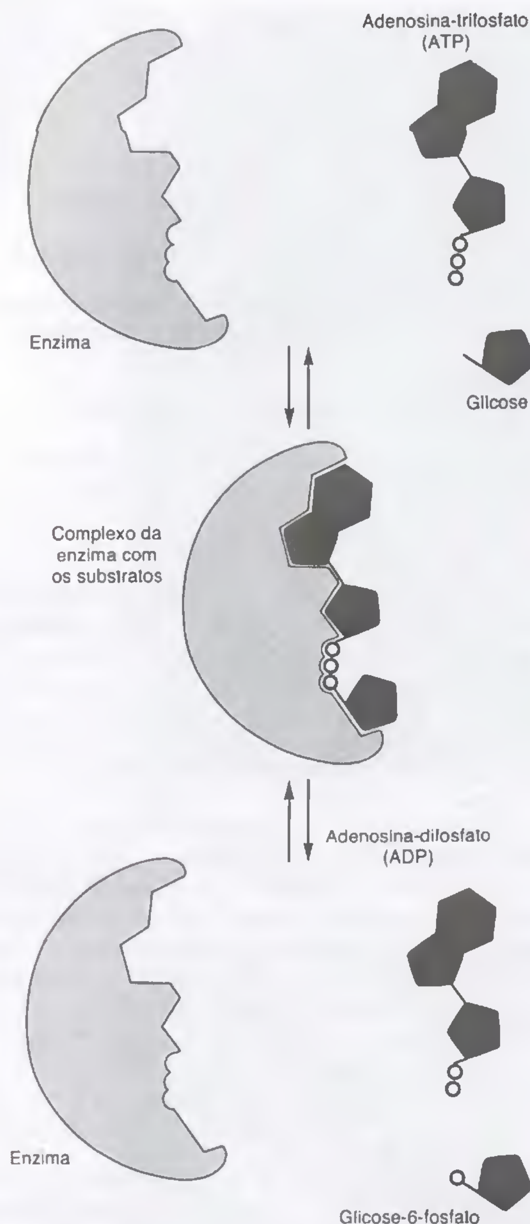


Fig. 3.11 Combinação reversível entre os substratos e o centro ativo da enzima. Demonstra-se também a ação enzimática (ATP + glicose → ADP + glicose-6-fosfato). Esta figura ilustra a importância da estrutura tridimensional de uma proteína (enzima) para sua atividade biológica. É necessário que o substrato se encaixe na molécula enzimática para que a enzima atue.

o substrato para a enzima seguinte. Esse conjunto de enzimas trabalhando em cooperação é denominado **cadeia enzimática**.

Um sistema muito eficiente e freqüente nas células é o representado pelos **complexos de moléculas enzimáticas**. Aqui, todas as enzimas da cadeia se associam para formar um conjunto de moléculas que se mantêm unidas por forças químicas fracas (estrutura protéica quaternária). Na célula da levedura, por exemplo, as enzimas que sintetizam ácidos graxos a partir de pequenas moléculas formam uma cadeia que consiste em sete enzimas que se associam para formar um complexo multienzimático. As reações processam-se em seqüência e as moléculas intermediárias mantêm-se presas ao complexo até a formação da molécula do ácido graxo. Isso torna o sistema mais rápido, pois os substratos não precisam deslocar-se muito de uma enzima para outra.

Outro complexo enzimático bem estudado é o da desidrogenase do piruvato. No microscópio eletrônico, o complexo enzimático da desidrogenase do piruvato mostra aspecto poliédrico, e foi sugerido um modelo segundo o qual suas enzimas devem estar organizadas (Fig. 3.12).

As cadeias enzimáticas mais bem organizadas e, portanto, mais eficientes são as que estão ligadas a membranas, como, por exemplo, a cadeia das enzimas respiratórias (transportadoras de elétrons) que estão presas à membrana interna das mitocôndrias. Nestes casos não há separação entre molécula enzimática e molécula estrutural, pois as diferentes proteínas são, ao mesmo tempo, parte da membrana e também dotadas de atividade enzimática.

As cadeias enzimáticas funcionam sob regulação

Muitas cadeias enzimáticas são auto-reguláveis, sobretudo pelo efeito do produto final da cadeia sobre a primeira enzima da seqüência. Por exemplo, a L-treonina é transformada em L-isoleucina através de uma cadeia de cinco enzimas (Fig. 3.13). A primeira enzima desta cadeia (E1) é a L-treonina-desaminase, cuja atividade é diminuída ou suprimida pela L-isoleucina. Deste modo, a falta de L-isoleucina provoca o funcionamento da cadeia em toda a sua intensidade, enquanto o excesso de L-isoleucina faz a cadeia diminuir de ritmo, ou mesmo parar a produção de mais L-isoleucina. Assim sendo, a concentração desse aminoácido na célula permanece dentro dos limites normais. Este tipo de controle é conhecido como **retroinibição** ou **inibição alostérica**. A enzima sensível a este tipo de controle — no exemplo dado, a L-treonina-desaminase — chama-se **enzima reguladora**, e a substância inibidora — no caso a L-isoleucina — é conhecida como **efetor** ou **modulador**.

Na regulação alostérica, o efetor combina-se com a enzima em um local diferente do centro ativo e denominado **centro alostérico**. Em conseqüência, ocorre uma modificação no centro ativo da enzima, cuja atividade catalítica é inibida (Fig. 3.14).

Além da regulação alostérica típica já descrita, as enzimas são reguladas por outros mecanismos. Por exemplo, nas enzimas que possuem mais de um centro ativo a união do substrato a um deles pode aumentar a afinidade dos outros pelo substrato, acelerando assim a atividade enzimática.

Isoenzimas são moléculas ligeiramente diferentes da mesma enzima

Certas enzimas existem sob formas moleculares ligeiramente distintas nos diversos tecidos, ou na mesma célula de determinada espécie animal. Nesses casos, a molécula da enzima é constituída por cadeias polipeptídicas (monômeros) diferentes, agrupadas em proporções variáveis. As diferenças de atividade entre as enzimas são conseqüência das diversas proporções dos monômeros em suas moléculas. As enzimas de uma mesma espécie animal que atacam o mesmo substrato mas que exibem diferenças na atividade, no pH ótimo de ação, na mobilidade eletroforética ou outras, são chamadas **isoenzimas**.

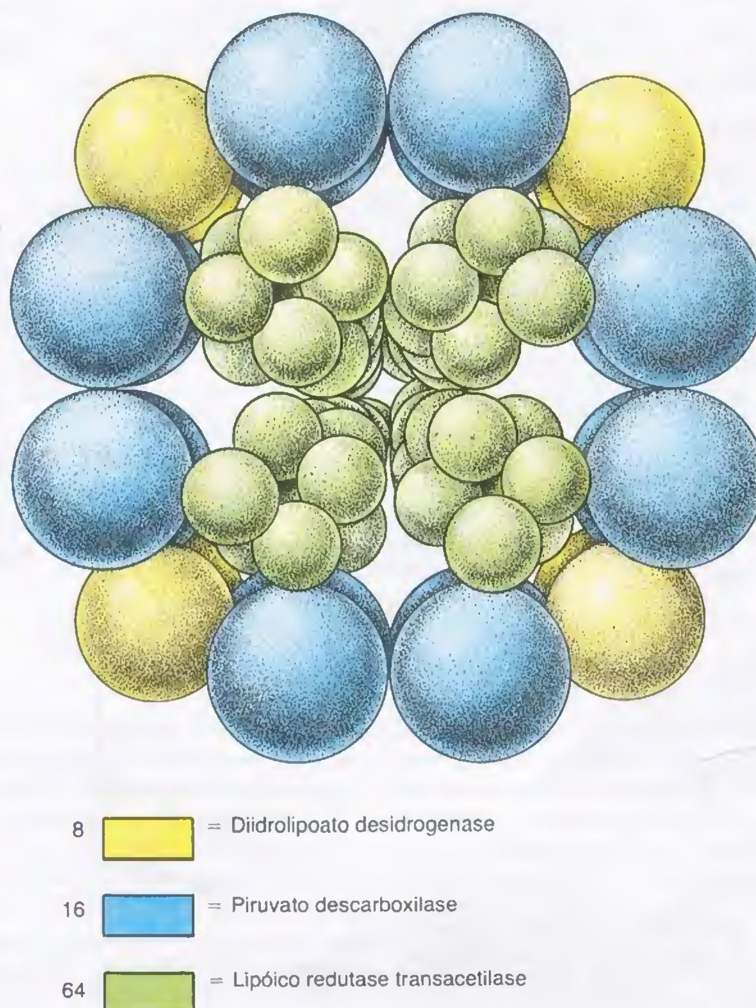


Fig. 3.12 Modelo do complexo enzimático da desidrogenase do piruvato. Cada esfera colorida representa uma molécula enzimática.

Um exemplo bem estudado é a isoenzima **desidrogenase do ácido láctico**. No rato, a molécula é constituída por quatro cadeias polipeptídicas (monômeros), de dois tipos diferentes, chamados M e H. Conforme a proporção desses dois monômeros, existem cinco desidrogenases do ácido láctico, cujas moléculas podem ser assim representadas:

1.°, 4 cadeias M	(M_4H_0)
2.°, 3 cadeias M + 1 cadeia H	(M_3H_1)
3.°, 2 cadeias M + 2 cadeias H	(M_2H_2)
4.°, 1 cadeia M + 3 cadeias H	(M_1H_3)
5.°, 4 cadeias H	(M_0H_4)

Essas cinco desidrogenases lácticas foram isoladas em forma pura. Todas atacam o mesmo substrato (ácido láctico), porém o fazem em velocidades diferentes. Portanto, do ponto de vista biológico, a principal distinção entre as isoenzimas é o grau de atividade de cada uma.

Está demonstrado que existe um gene que determina a seqüência de aminoácidos do monômero M e outro que determina a do monômero H. Conforme a maior ou menor atividade de cada um destes genes, haverá maior produção do mRNA para M ou para H e os polirribosomas produzirão diferentes quantidades de M e H. Como estes monômeros se unem espontaneamente, ao acaso, para constituir as enzimas, as proporções de M e de H vão depender da atividade daqueles genes. Trata-se de um controle gênico, pelo qual, alterando as proporções dos monômeros produzidos (cadeias polipeptídicas), os genes influem na estrutura quaternária das proteínas e podem modular a sua atividade enzimática.

Os 20 aminoácidos possibilitam a construção de enorme variedade de moléculas protéicas, com funções diversificadas

As proteínas são os componentes químicos mais diversificados da célula, por serem constituídas de 20 aminoácidos diferentes. Esta diversificação estrutural se reflete nas suas múltiplas funções biológicas (Tabela 3.4), pois, dos componentes macromoleculares das células, são os mais polifuncionais. Além da atividade enzimática, as proteínas têm importante função estrutural (nos filamentos intermediários, microfilamentos e microtúbulos), informacional (nos hormônios protéicos) no movimento das células (exemplificado pela

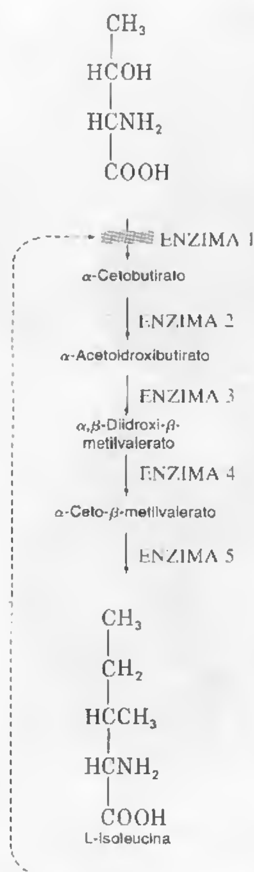


Fig. 3.13 Regulação (inibição) alostérica. A L-treonina é transformada em L-isoleucina através de uma cadeia de cinco enzimas. Mas a primeira enzima desta cadeia é inibida pela L-isoleucina. Assim, o excesso de L-isoleucina bloqueia e sua falta estimula a síntese desse aminoácido.

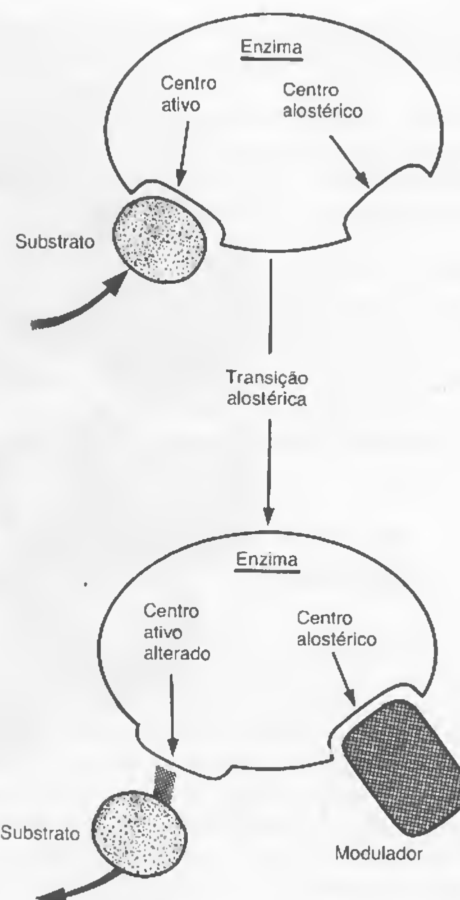


Fig. 3.14 Regulação alostérica. A fixação do modulador no centro alostérico modifica o centro ativo, impede a fixação do substrato e inibe a ação enzimática.

atividade motora do complexo actina-miosina) e, finalmente, uma pequena importância como fonte energética. A quase-totalidade da energia consumida pelas células é fornecida pelas moléculas de lipídios e hidratos de carbono.

Ácidos nucléicos são polímeros de nucleotídeos

Os ácidos nucléicos são constituídos pela polimerização de unidades chamadas **nucleotídeos.**

Cada nucleotídeo contém resíduos de uma molécula de ácido fosfórico, uma de pentose e uma de base púrica ou pirimídica (Fig. 3.15).

As bases púricas mais encontradas nos ácidos nucléicos são a **adenina** e a **guanina** (Figs. 3.15 e 3.16), em geral designadas pelas iniciais A e G, respectivamente. As principais bases pirimídicas são a **timina**, a **citosina** e a **uracila** (Fig. 3.16), designadas pelas letras T, C e U.

Além dos polímeros de nucleotídeos, que constituem as moléculas dos ácidos nucléicos, as células contêm quantidades relativamente grandes de nucleotídeos livres, desempenhando sobretudo as funções de coenzimas.

Por hidrólise parcial é possível retirar o radical fosfato dos nucleotídeos. Aparecem então compostos denominados **nucleosídeos**, constituídos por uma pentose e uma base púrica ou pirimídica (Fig. 3.17).

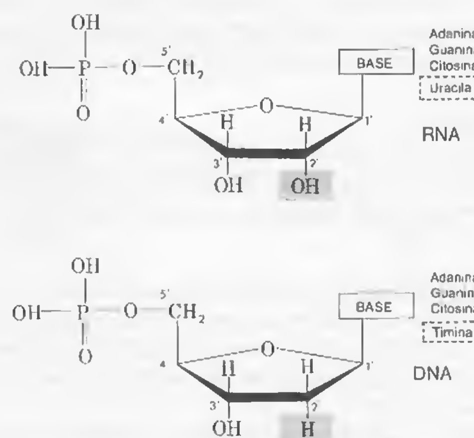


Fig. 3.15 Nucleotídeos do RNA e do DNA. As bases diferentes (uracila e timina) estão assinaladas. No carbono 2', a desoxirribose possui um átomo de oxigênio a menos (observar os retângulos cinza).

DNA | DNA e RNA | RNA

Purinas: Adenina, Guanina

Pirimidinas: Timina, Citosina, Uracila

Pentoses: Desoxirribose, Ribose

Ácido fosfórico

Fig. 3.16 Componentes dos ácidos nucléicos (RNA e DNA).

Os ácidos nucléicos são moléculas informacionais que controlam os processos básicos do metabolismo celular, a síntese de macromoléculas, a diferenciação celular e a transmissão do patrimônio genético de uma célula para as suas descendentes.

Cada molécula de ácido nucléico contém pelo menos uma cadeia de nucleotídeos (polinucleotídeo), formada por ligações diéster-fosfato entre os carbonos 3' e 5' da pentose, de acordo com o que mostra a Fig. 3.18.

Distinguem-se dois tipos de ácidos nucléicos: o **desoxirribonucléico** ou **DNA** e o **ribonucléico** ou **RNA**. No DNA, a pentose encontrada é a desoxirribose, e as bases são adenina, guanina, citosina e timina. No RNA, a pentose é a ribose, e existe uridina em substituição à timina; as outras bases são comuns aos dois tipos de ácidos nucléicos (Tabela 3.3).

O DNA é o repositório da informação genética e a transmite para as células-filhas

O ácido desoxirribonucléico ou DNA é o responsável pelo armazenamento e transmissão da informação genética. É encontrado principalmente nos cromossomas e, em pequenas quantidades, nas mitocôndrias e nos cloroplastos. Nos cromossomas das células eucariontes, o DNA está associado a proteínas básicas, principalmente **histonas**.

A molécula de DNA consiste em duas cadeias de nucleotídeos dispostas em hélice em torno de um eixo. O passo destas hélices é dirigido no sentido da esquerda para a direita (Figs. 3.19 e 3.20). A direção das ligações 3' e 5' diéster-fosfato de uma cadeia é inversa em relação à da outra cadeia, como mostra a Fig. 3.19. Diz-se que essas cadeias são antiparalelas. Em função deste fato, em cada extremidade da molécula, uma das cadeias polinucleotídicas termina em 3' e a outra em 5' (Fig. 3.19).

As bases púricas e pirimídicas de cada cadeia polinucleotídica situam-se dentro da hélice dupla, em planos paralelos entre si e perpendiculares ao eixo da hélice, como se fossem degraus de uma escada. Em cada plano ou degrau da escada, a base de uma cadeia forma par com a base da cadeia complementar. Devido às dimensões das moléculas das bases, o pareamento só tem lugar entre a timina e a adenina, ou entre a guanina e a citosina, das cadeias complementares. Portanto, considerando-se os dois polinucleotídeos que constituem a molécula de DNA, as bases estão sempre pareadas na seqüência T-A ou G-C. Isto explica a existência, no DNA, de número igual de moléculas de T e A, assim como de G e C.

Na hélice dupla, as bases unem-se através de pontes de hidrogênio (Fig. 3.19), principais responsáveis pela estabilidade da hélice. Quando as pontes de hidrogênio são rompidas — por exemplo, pelo aquecimento do DNA em solução —, os dois filamentos polinucleotídicos da hélice sofrem desnaturação, separando-se; quando baixa a temperatura, eles se unem novamente.

A desnaturação pelo rompimento das pontes de hidrogênio pode ser completa ou parcial (Fig. 3.21). Esta desnaturação ocorre mais cedo nas ligações AT, que têm duas pontes de hidrogênio, sendo as ligações CG mais resistentes, pois têm três pontes de hidrogênio (Fig. 3.19). A desnaturação parcial permite a identificação das zonas ricas em AT e das zonas ricas em CG, sendo estes últimos segmentos mais resistentes à desnaturação. Em

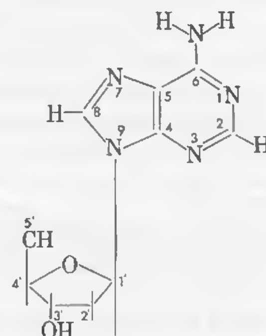


Fig. 3.17 Estrutura molecular dos nucleosídeos. No exemplo, o nucleosídeo constituído pela adenina combinada à desoxirribose.

Tabela 3.3 Características dos principais tipos de ácidos nucléicos

	DNA	tRNA	mRNA	rRNA
COMPONENTES	ácido fosfórico, desoxirribose, adenina, guanina, citosina e timina	ácido fosfórico, ribose, adenina, guanina, citosina, uracila, timina, ácido pseudo-uridílico, metilcitosina, dimetil-guanina	ácido fosfórico, ribose, adenina, guanina, citosina e uracila	ácido fosfórico ribose, adenina, guanina, citosina e uracila
FUNÇÕES	comanda todo o funcionamento da célula; transmite a informação genética para as outras células	transporta os aminoácidos unindo o seu anticódon ao códon do mRNA; determina a posição dos aminoácidos nas proteínas	através da seqüência de suas bases, determina a posição dos aminoácidos nas proteínas	combina-se com o mensageiro, para formar os polirribosomas
LOCALIZAÇÃO	núcleo das células eucariontes; nucleóide das procariontes; mitocôndrias e cloroplastos; alguns vírus	principalmente no citoplasma; menor quantidade no núcleo	principalmente no citoplasma; menor quantidade no núcleo	principalmente no citoplasma; menor quantidade no núcleo
TAMANHO DA MOLÉCULA	muito grande; difícil de determinar	25.000 a 30.000 dáltons	depende do tamanho da proteína que codifica; variável entre 5×10^4 a 5×10^{16} dáltons	5 S a 28 S
FORMA	hélice dupla; filamento simples, em certos vírus	"folha de trevo"	filamento simples	ribosomas tamanho: células eucariontes 2,3 nm (80 S) células procariontes 1,8 nm (70 S)

moléculas simples de DNA, como as dos bacteriófagos, esta técnica possibilita a localização de zonas com diferentes freqüências de nucleotídeos ao longo do filamento de DNA.

Ao longo da molécula de DNA, a distância entre as bases é de 0,34 nm, e cada volta completa da hélice contém 10 nucleotídeos (Fig. 3.20). A hélice dupla tem um diâmetro de 2 nm e sua superfície mostra dois sulcos, um dos quais mais acentuado que o outro.

As bases (hidrofóbicas) situam-se dentro da hélice, e os resíduos de desoxirribose (hidrofílicos) e de ácido fosfórico (ionizado e hidrofílico) localizam-se na periferia, em contato com a água intracelular. Ao lado das pontes de hidrogênio que representam o elemento principal de união entre os dois filamentos polinucleotídicos da hélice dupla, a interação hidrofóbica das bases pareadas contribui para manter a estabilidade da hélice de DNA. Os grupos fosfóricos, ionizados negativamente, permitem ao ácido desoxirribonucléico combinar-se com proteínas básicas, isto é, carregadas positivamente, ou com outras moléculas eletricamente positivas.

Devido à sua fragilidade e enorme comprimento, tem sido difícil determinar o tamanho exato das moléculas de DNA. Sabe-se, por exemplo, que a molécula de DNA do bacteriófago lambda, que infecta a bactéria *Escherichia coli*, tem um peso de 32 milhões de dáltons e comprimento de 17,2 µm. Na *Escherichia coli*, o cromosoma é uma molécula de DNA, com comprimento de 1,2 mm e peso molecular de 2.800.000.000 de dáltons.

O RNA transfere a informação genética do DNA para as proteínas

Ao contrário do DNA, cuja molécula quase sempre é formada por duas cadeias polinucleotídicas, a molécula de RNA é um filamento único, e só existe excepcionalmente, sob a forma de filamentos duplos complementares. Nos dois casos, as exceções são encontradas nos vírus: alguns têm DNA em filamento único, enquanto outros têm RNA em cadeia dupla complementar.

Dos pontos de vista funcional e estrutural, distinguem-se três variedades principais de ácido ribonucléico:

1. RNA **de transferência** ou tRNA;
2. RNA **mensageiro**, abreviadamente mRNA; e
3. RNA **ribosômico** ou rRNA.

RNA de transferência

Dos três tipos de ácidos ribonucléicos, o tRNA é o que possui moléculas menores. Estas são constituídas de 75 a 90 nucleotídeos e têm peso molecular compreendido entre 23.000 e 30.000 dáltons. Sua função é transferir os aminoácidos para as **posições corretas** nas cadeias polipeptídicas em formação nos complexos de ribosomas e RNA mensageiro (polirribosomas). Para isto, o tRNA possui a propriedade de se combinar com aminoácidos

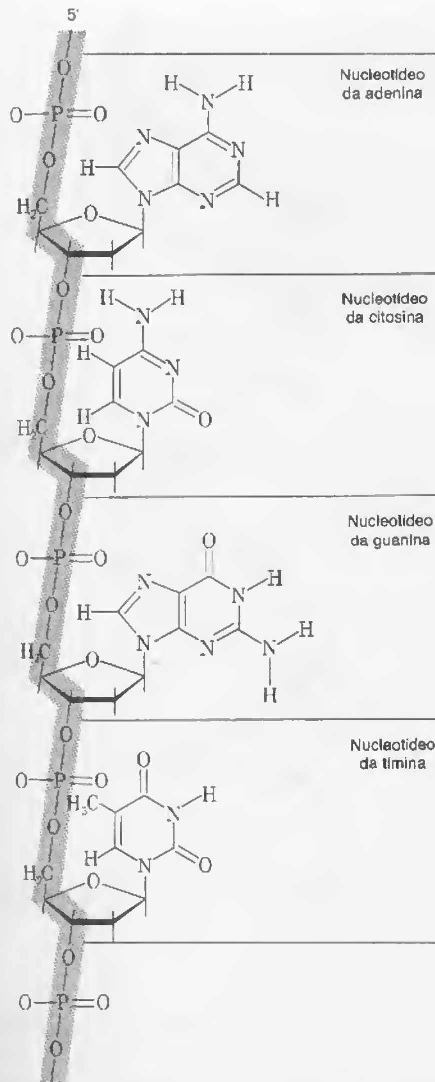


Fig. 3.18 Polinucleotídeo do DNA.

e é capaz de reconhecer determinados locais da molécula do mRNA constituídos por uma seqüência de três bases. Estas seqüências, típicas para cada aminoácido, são denominadas **códon** (v. Cap. 9). A seqüência de três bases na molécula do tRNA e que reconhece o códon chama-se **anticódon** (Fig. 3.22). Para cada aminoácido existe pelo menos um tRNA.

A molécula do tRNA é um filamento com uma extremidade terminando sempre pela seqüência CCA, isto é, pelo ácido adenílico (A) precedido de duas moléculas de ácido citidílico (C).

Graças a um processo enzimático que consome energia liberada por hidrólise de ATP (v. Cap. 4), uma hidroxila do ácido adenílico da extremidade CCA é esterificada por um L-aminoácido, formando-se assim uma molécula de **Acil-tRNA**. A enzima catalisadora desta esterificação é específica para cada aminoácido. A molécula do tRNA possui uma região que é reconhecida pela enzima, e, deste modo, cada aminoácido é ligado ao seu tRNA.

Devido às pontes de hidrogênio que se estabelecem entre as suas bases, todos os tRNAs apresentam segmentos das moléculas formados por uma hélice dupla. A representação plana, esquemática, da molécula do tRNA (Fig. 3.22) tem o aspecto de uma folha de trevo, a qual mostra o anticódon em um de seus lados.

Além das bases adenina, guanina, citosina e uracila, comumente encontradas no RNA, o tRNA contém outras bases que não aparecem nos outros tipos de ácido ribonucléico (Tabela 3.3). Entre essas bases típicas do tRNA, estão, por exemplo, a **hipoxantina** e a **metilcitosina**. O tRNA possui ainda **ácido ribotimidílico**, que é um nucleotídeo constituído por ácido fosfórico, ribose e timina, base geralmente encontrada no DNA. Além disso, o tRNA apresenta em sua molécula o **ácido pseudo-uridílico**, que difere do ácido uridílico comum por apresentar a ribose ligada ao carbono 5 da uracila, e não ao nitrogênio 3, como é habitual (Fig. 3.23). Em conclusão, vê-se que o tRNA possui uma série de características que o diferenciam dos outros tipos de RNA, facilitando a sua identificação.

As regiões do tRNA que contêm as bases não-habituais talvez sejam importantes para determinar o formato da molécula, pois nestas regiões não se formam pontes de hidrogênio entre as bases (Fig. 3.22).

Os tRNAs são inicialmente sintetizados sobre os filamentos de DNA, como moléculas maiores que passam por um processamento (*splicing*) tomando-se menores, antes de migrarem para o citoplasma. Este processamento do tRNA consiste na remoção de determinados pedaços da molécula maior e soldagem dos fragmentos que vão constituir a molécula final do tRNA. É um processo semelhante ao que será descrito adiante, neste capítulo, ao se examinar o mRNA, onde o assunto tem sido mais estudado.

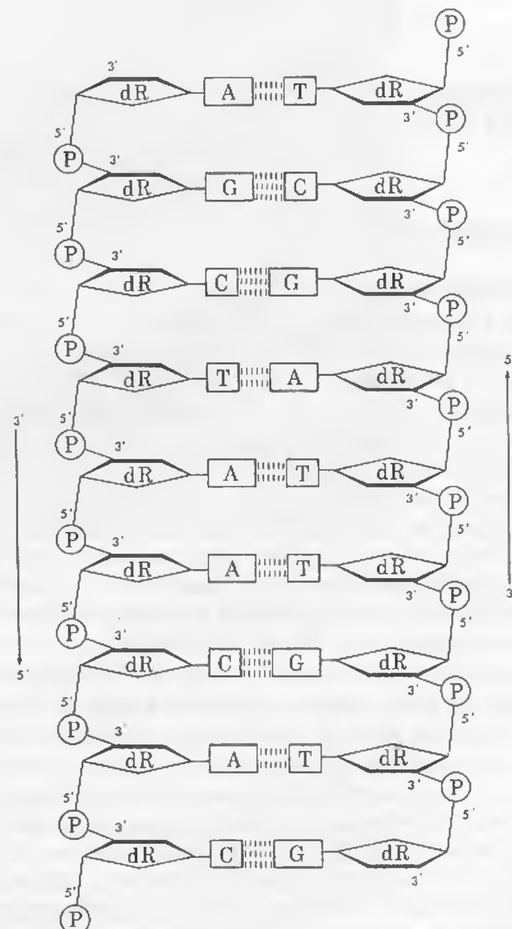


Fig. 3.19 Pequena parte de uma molécula de DNA mostrando o arranjo antiparalelo dos polinucleotídeos. Entre T e A existem duas pontes de hidrogênio e, entre G e C, três.

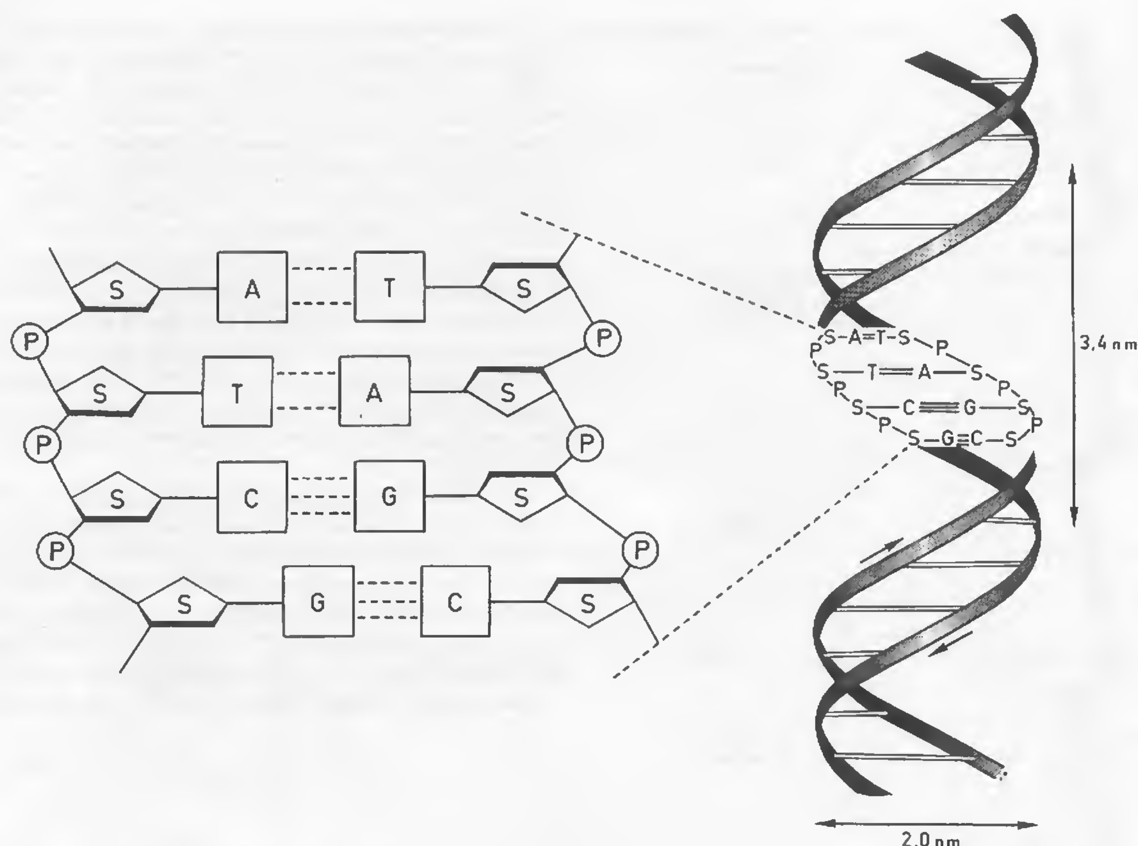


Fig. 3.20 Esquema da estrutura em hélice dupla do DNA, segundo Watson e Crick. **A**, adenina; **T**, timina; **C**, citosina; **G**, guanina; **P**, fosfato e **S**, desoxirribose.

RNA mensageiro

O mRNA é sintetizado nos cromosomas, como os demais RNAs da célula, e representa a transcrição de um segmento de uma das cadeias da hélice de DNA. Note-se que, durante a síntese do mRNA, os filamentos de um segmento da molécula de DNA separam-se temporariamente. O peso molecular do mRNA varia de acordo com o tamanho da molécula protéica que ele vai codificar no citoplasma. Evidentemente, a molécula de mRNA é bem maior do que a de proteína por ele formada, porque são necessários três nucleotídeos para codificar um aminoácido. Além disso, muitas proteínas são sintetizadas com um segmento extra, formado por vários aminoácidos que são removidos no acabamento final da proteína. Por isso, o peso molecular dos mRNAs é da ordem de centenas e até milhares de dáltons. Nas células procariontes, as moléculas de mRNA podem ser ainda maiores, porque, nas bactérias, uma longa molécula de mRNA pode ser traduzida a partir de locais diferentes, originando mais de uma proteína, conforme o local do mRNA onde a tradução teve início.

Cada molécula de mRNA tem um prolongamento (*tail*) de poli-A que é adicionado ainda no interior do núcleo celular, assim que a molécula de mRNA é transcrita, por uma enzima que não requer molde (*template*) de DNA. Portanto, este segmento do mRNA não está codificado no DNA. Na outra extremidade do mRNA (extremidade 5'), um pequeno capuz (*cap*) nucleotídico é adicionado por outras enzimas.

Os mRNAs citoplasmáticos derivam de precursores nucleares conhecidos como hnRNAs (*heterogenous* RNAs), assim chamados por apresentarem grande heterogeneidade nos pesos moleculares e na composição de nucleotídeos. A maioria dos hnRNAs tem moléculas enormes, com até 50.000 nucleotídeos. Estas moléculas são partidas no núcleo, de modo ordenado. Certos pedaços são removidos e as extremidades dos segmentos que codificam proteínas se soldam (*splicing*), formando-se a molécula acabada de mRNA, que migra para o citoplasma.

Fica claro do exposto que, nas células eucariontes, o DNA que transcreve os mRNAs é constituído por partes que vão ser traduzidas em proteínas, denominadas **éxons**, e em partes que apenas separam os éxons. Estas partes "silenciosas" são denominadas **íntrons** (v. Cap. 9).

Portanto, o DNA inicialmente transcreve uma molécula enorme de hnRNA da qual os segmentos sem significado para a síntese protéica são removidos, ocorrendo então a soldagem precisa dos segmentos que levam a codificação para um tipo de molécula protéica e, assim, fica formada uma molécula de mRNA. Todavia, alguns genes não possuem íntrons e as moléculas de mRNA se formam diretamente do DNA, sem passar pela fase de hnRNA.

Íntrons e hnRNA só foram encontrados em células eucariontes, sendo muito pouco provável que existam nas procariontes.

RNA ribosômico

O RNA ribosômico é muito mais abundante do que os outros dois tipos de RNA, constituindo 80% do RNA celular. Existe combinado com proteínas, formando partículas facilmente visí-



Fig. 3.21 Desnaturação parcial da molécula de DNA do bacteriófago **T7**. A separação dos segmentos polinucleotídicos é mais precoce nos segmentos com abundância de ligações AT (setas). Micrografia eletrônica. (Vollenweider, H.J., J.M. Sogo and T. Koller. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72*:83, 1975. Reproduzido com permissão.)

veis ao microscópio eletrônico e denominadas **ribosomas**. Quando presos a filamentos de RNA mensageiro, os ribosomas formam os **polirribosomas** (Fig. 3.24), onde tem lugar a síntese de proteínas.

Existem nas células dois tipos de ribosomas que se distinguem por seus coeficientes de sedimentação determinados na ultracentrífuga e expressos em unidades S ou Svedberg. Os ribosomas das células procariontes têm coeficiente de sedimentação de 70 S e são menores do que os ribosomas das células eucariontes, cujo coeficiente de sedimentação é de 80 S. Ambos os tipos de ribosomas são formados por duas subunidades, uma maior e outra menor, com características funcionais e estruturais diferentes.

As subunidades se prendem de modo reversível no início da síntese da molécula protéica, separando-se quando a proteína está terminada. A subunidade maior dos ribosomas das células eucariontes contém três tipos de RNA, com sedimentação de 28 S, 5,8 S e 5 S, e a dos ribosomas das procariontes possui dois tipos de RNA, um de 23 S e outro de 5 S. A subunidade menor apresenta apenas um tipo de RNA: 18 S nas células eucariontes e 16 S nas procariontes.

Tabela 3.4 Principais funções celulares das moléculas — estas aparecem na ordem crescente de sua diversidade funcional

Tipo de molécula	Ácido nucléico (DNA e RNA)	Lipídio	Polissacarídeo	Proteína
Grau de diversidade funcional	1	2	3	4
FUNÇÕES	informacional	energética estrutural informacional	energética estrutural informacional	enzimática estrutural informacional movimentação celular energética

Os ribosomas das mitocôndrias e dos cloroplastos são iguais aos das células procariontes, dado que apóia a interpretação de que estas duas organelas transdutoras de energia se originaram de bactérias que se tornaram simbiontes das células eucariontes.

Cerca de 50 variedades de proteínas foram identificadas nos ribosomas e constituem aproximadamente a metade da massa destes corpúsculos.

A basofilia citoplasmática demonstrável pelos corantes básicos e removível pela ribonuclease deve-se aos ribosomas. Estes são particularmente abundantes nas células que sintetizam grandes quantidades de proteínas, as quais têm o citoplasma fortemente basófilo.

O RNA pode ter ação enzimática

Em alguns casos, o RNA tem ação catalítica, atuando como uma enzima. A atividade catalítica do RNA foi descoberta ao se estudar

Fig. 3.22 Estrutura do RNA de transferência para o aminoácido tirosina. Além das bases habituais, este tRNA contém as seguintes bases: **mG** = N-2-metilguanosina; **dhU** = N-6-diidrouridina; **omG** = 2'-O-metilguanosina; **dmG** = 2'-dimetilguanosina; **dmA** = N-6-dimetiladenosina; **5mC** = 5-metilcitosina. A letra grega psi (Ψ) representa o ácido pseudo-uridílico.

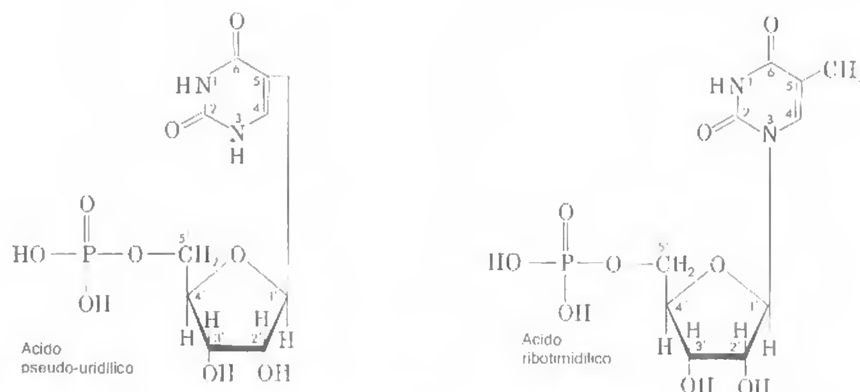


Fig. 3.23 Dois nucleotídeos encontrados no tRNA: no ácido pseudo-uridílico, a ribose liga-se ao carbono 5 da uridina, e não ao carbono 3, como ocorre no ácido uridílico. O ácido ribotimidílico contém timina, uma base que usualmente é encontrada no DNA.

a síntese dos RNAs de *Tetrahymena*, um protozoário ciliado. Descobriu-se que estes RNAs são inicialmente moléculas muito grandes das quais certos segmentos são removidos e as partes restantes são soldadas (*splicing*), formando-se assim a molécula final do mRNA. Todo o processo se realiza, como foi comprovado *in vitro*, sem a participação de proteínas enzimáticas. O segmento de RNA que vai ser removido (íntron) catalisa sua própria remoção e a união das extremidades da molécula partida. Esse segmento de RNA, *in vitro*, é capaz de catalisar a polimerização de polinucleotídeos pequenos em polinucleotídeos com mais de 30 nucleotídeos, tendo sido chamado de **ribozima**.

Outros RNAs com atividade catalítica foram descobertos logo depois, como, por exemplo, os tRNAs, que quase sempre também são sintetizados em tamanho maior. Neste caso foi observado que a clivagem para produzir a molécula de tRNA final, de tamanho menor, é catalisada por um complexo RNA-proteína (**ribonuclease P**). Mas a especificidade e atividade enzimática deste complexo depende mais do RNA do que da proteína. Separando-se o complexo RNA-proteína em suas duas partes, somente o RNA tem atividade catalítica, embora o complexo inteiro seja mais ativo. Portanto, neste caso o RNA é essencial para a atividade enzimática e a proteína exerce um papel auxiliar, secundário.

A descoberta de que o RNA pode ter atividade enzimática teve grande repercussão sobre as hipóteses quanto à origem da vida na Terra. É possível que a molécula inicial das futuras células tenha sido um RNA capaz de auto-replicação. Esse RNA primordial teria servido de molde (*template*) para o DNA, começando em seguida a síntese dirigida das proteínas.

Pela técnica de hibridização se podem caracterizar as moléculas de ácidos nucléicos

Existem no citoplasma muitos RNAs diferentes, necessários para a síntese das numerosas proteínas celulares. A caracterização dos RNAs mensageiros não é fácil. Uma técnica que se tem mostrado muito útil para o seu estudo é a **hibridização** com DNA. A hélice dupla de DNA é formada por duas cadeias unidas por pontes de hidrogênio que são forças fracas. As duas cadeias de DNA podem ser separadas facilmente pelo aquecimento brando em pH alcalino e podem também se recombinar pelo resfriamento lento. Mas as cadeias de DNA separadas podem combinar-se com moléculas de RNA, processo muito seguro para caracterizar uma molécula de RNA, pois ela se combina exclusivamente com o segmento de DNA do qual foi transcrito.

Os lipídios formam reservas nutritivas e têm papel estrutural nas membranas celulares

Os compostos de carbono extraídos de células e tecidos por solventes orgânicos não-polares — como éter, clorofórmio e benzeno — são chamados **lipídios**. Em virtude de serem definidos por sua solubilidade nestes solventes, e não pela estrutura química, o grupo dos lipídios compreende substâncias com moléculas muito diferentes.

De acordo com suas funções principais, os lipídios celulares podem ser divididos em duas categorias: **lipídios de reserva nutritiva** e **lipídios estruturais**. Estes têm papel relevante na manutenção da estrutura das membranas celulares (v. Cap. 5).

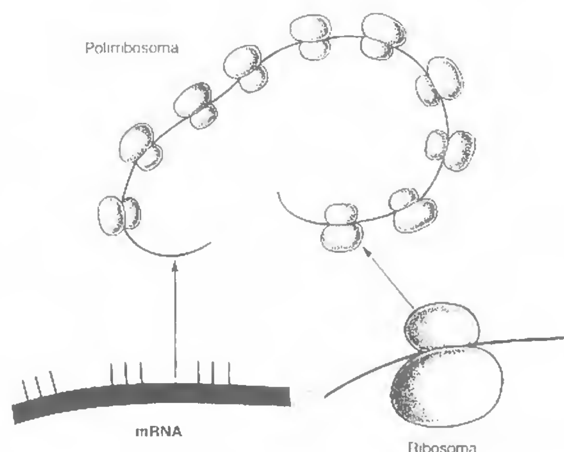


Fig. 3.24 Combinação do RNA mensageiro com ribosomas para formar polirribosomas.

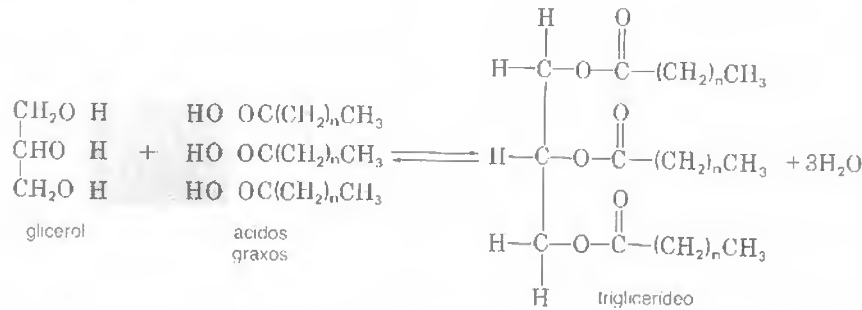


Fig. 3.25 Substituição das hidroxilas da glicerina por ácidos graxos, para formar uma molécula de triacilglicerol ou triglicerídeo (gordura neutra).

As vitaminas A, E e K são lipídios dotados de importantes atividades fisiológicas. Os hormônios esteróides, entre os quais os da adrenal, ovário e testículo, e o 1,25-diidroxicolecalciferol (substância ativa formada no organismo dos mamíferos a partir da "vitamina" D) são lipídios informacionais (transportam informações). Todavia, como exercem funções especializadas e não são constituintes gerais das células, não serão estudados neste capítulo.

Lipídios de reserva nutritiva. As reservas nutritivas de natureza lipídica compõem-se de **gorduras neutras**. Estas são ésteres de ácidos graxos com o triálcool **glicerol** ou **glicerina**. A molécula da gordura neutra pode apresentar um, dois ou, mais comumente, três resíduos de ácidos graxos (Fig. 3.25). Quando existe mais de um ácido graxo, eles podem ser iguais ou diferentes.

O número de átomos de carbono nos ácidos graxos é quase sempre par, porque suas moléculas são sintetizadas a partir de resíduos com dois átomos de carbono. Os ácidos graxos mais freqüentes nas gorduras neutras são os de 16 e 18 átomos de carbono.

Os depósitos intracelulares de lipídios constituem-se quase exclusivamente por gorduras neutras, nas quais o glicerol está esterificado por três ácidos graxos. São, portanto, depósitos de **triacilgliceróis** ou **triglicerídeos**, com pequena quantidade de diacilgliceróis e monoacilgliceróis. Estes depósitos ocorrem em quase todos os tipos celulares, havendo, porém, células especializadas para o acúmulo de gorduras neutras, as **células adiposas**.

Lipídios estruturais. Estes lipídios são componentes estruturais de todas as membranas celulares: membrana plasmática, envoltório nuclear, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, endosomas, mitocôndrias, cloroplastos, lisosomas etc. Muitas propriedades dessas membranas decorrem das características químicas e físicas de seus lipídios. Os lipídios estruturais são mais complexos que os de reserva. Suas moléculas são longas e dotadas de uma extremidade **polar** — isto é, com carga elétrica — e uma longa cadeia **apolar**, não-ionizada. A extremidade polar é **hidrofílica**, enquanto a porção apolar, constituída geralmente por duas cadeias alifáticas, é **hidrofóbica** e, portanto, solúvel em lipídios.

Os lipídios que exercem papel essencialmente estrutural, fazendo parte do sistema de membranas das células, são os **fosfolipídios (fosfoglicerídeos** e **esfingolipídios)**, os **glicolipídios** e o **colesterol**.

Fosfoglicerídeos. Nestes fosfolipídios, uma das hidroxilas primárias, isto é, a do carbono 1 ou a do 3 do glicerol, é esterificada pelo ácido fosfórico. As outras duas hidroxilas são esterificadas por ácidos graxos, sendo o ácido graxo do carbono 2 em geral insaturado (Fig. 3.26).

O fosfoglicerídeo mais simples é o **ácido fosfatídico**, constituído apenas por um resíduo de glicerol, um de ácido fosfórico e dois de ácidos graxos. O ácido fosfatídico existe em pequena quantidade nas membranas celulares. Os fosfoglicerídeos mais encontrados nessas membranas são **fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina** e **fosfatidilinositol**.

Esfingolipídios. Um exemplo de esfingolipídio é a **esfingomielina**, muito abundante nas bainhas de mielina do tecido nervoso. A bainha de mielina funciona como isolante elétrico de prolongamentos das células nervosas, sendo formada por dobras concêntricas da membrana plasmática de células especializadas.

A esfingomielina é constituída por uma molécula de colina, uma de ácido fosfórico, uma de esfingosina e uma de ácido graxo (Fig. 3.27).

A principal característica estrutural dos **esfingolipídios** é a presença da longa cadeia de **esfingosina**, ao lado de uma cadeia de ácido graxo, que se prende à esfingosina por uma ligação éster (Fig. 3.27). Tal como os fosfoglicerídeos, os esfingolipídios possuem uma extremidade polar e duas caudas apolares.

Os glicolipídios têm extremidades polares formadas por glicídeos, principalmente D-galactose (Fig. 3.28). Suas moléculas são, em geral, constituídas por moléculas glicídicas, uma molécula de glicerol e duas de ácidos graxos. Os glicolipídios não contêm ácido fosfórico. Entre os glicolipídios importantes, encontram-se os **gangliosídeos**, que possuem glicídeos muito complexos. Por exemplo, do tecido nervoso isolou-se o gangliosídeo G_{M2} constituído pelas seguintes moléculas: um ácido graxo, esfingosina, D-glicose, D-galactose, N-acetil-D-galactosamina e ácido N-acetilneuramínico.

Os cerebrosídeos (Fig. 3.29) são **glicoesfingolipídios**, pois suas moléculas contêm esfingosina e glicídeos. Os cerebrosídeos são abundantes nas membranas das células do tecido nervoso, sobretudo nas bainhas de mielina.

Colesterol. O colesterol é um esterol, isto é, um composto que contém o núcleo peridrociclopentanofenantreno, com uma hidroxila no carbono 3 e uma cadeia alifática, com oito ou mais átomos de carbono, ligada ao carbono 17 do núcleo (Fig. 3.30).

O colesterol está presente na membrana plasmática das células animais, ocorrendo, porém, em quantidade muito menor nas membranas das mitocôndrias e do retículo endoplasmático. O colesterol reduz a fluidez das membranas (v. Cap. 5).

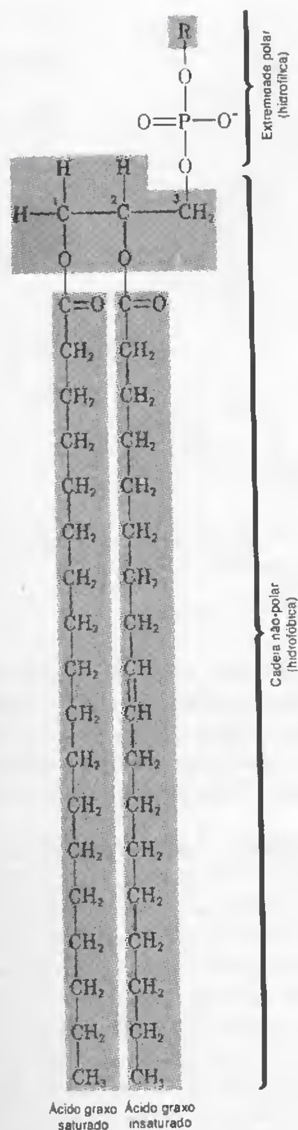


Fig. 3.26 Fórmula dos fosfoglicerídeos. O radical **R** pode ser a colina, a etanolamina, a serina ou a treonina. Esses fosfolipídios são denominados fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidiltreonina, respectivamente.

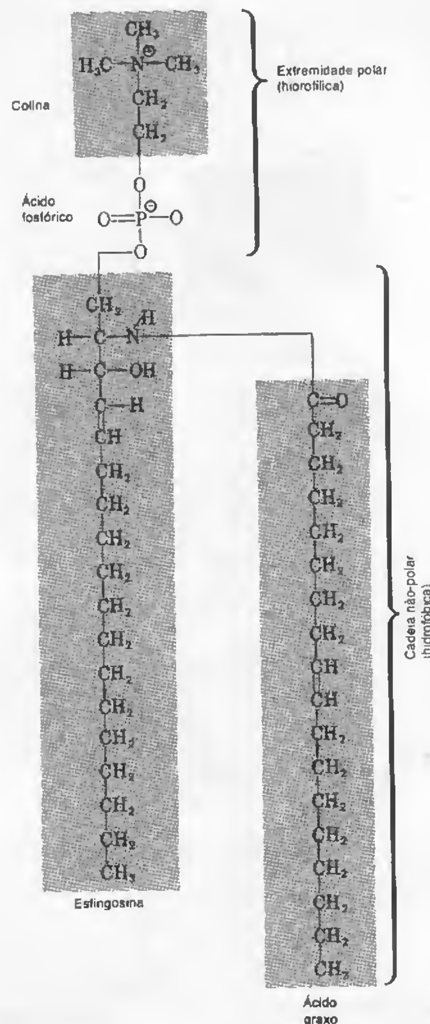


Fig. 3.27 Fórmula da molécula de esfingomielina.

As células dos vegetais não possuem colesterol, que é então substituído por outros esteróis, denominados coletivamente de **fitoesteróis**.

A presença de longas cadeias hidrofóbicas nos lipídios é de grande importância biológica, pois são elas que possibilitam a **interação hidrofóbica** responsável pela associação de lipídios para formar a bicamada lipídica das membranas celulares. A fixação das proteínas integrais das membranas é devida à interação das porções hidrofóbicas das moléculas dessas proteínas com os lipídios das membranas. A interação hidrofóbica também é importante no transporte de lipídios no plasma. Por exemplo, os esteróides circulam presos a uma região hidrofóbica da superfície da molécula de albumina, que é solúvel em água.

Os lipídios têm menor diversidade funcional do que as proteínas e polissacarídeos. Têm principalmente função energética e estrutural. Sua atividade informacional é restrita a alguns hormônios esteróides.

Os polissacarídeos formam reservas nutritivas e unem-se a proteínas para formar glicoproteínas (função enzimática e estrutural) e glicosaminoglicanas (função estrutural)

Os polissacarídeos são polímeros de monossacarídeos. Há polissacarídeos com moléculas lineares, enquanto outros têm moléculas ramificadas. A molécula de alguns polissacarídeos é constituída pela repetição de um único tipo de monossacarídeo. São os polissacarídeos simples ou homopolímeros. Por exemplo, o **amido** e o **glicogênio** são polímeros simples de D-glicose e não contêm outro tipo de molécula. Os polissacarídeos complexos (heteropolímeros), constituídos por mais de um tipo de monossacarídeo, são menos freqüentes nas células, porém alguns são biologicamente muito importantes.

Os polissacarídeos encontram-se associados à superfície externa da membrana celular, desempenhando papel estrutural e informacional. São encontrados também como reserva nutritiva, que a célula utiliza quando há necessidade metabólica.

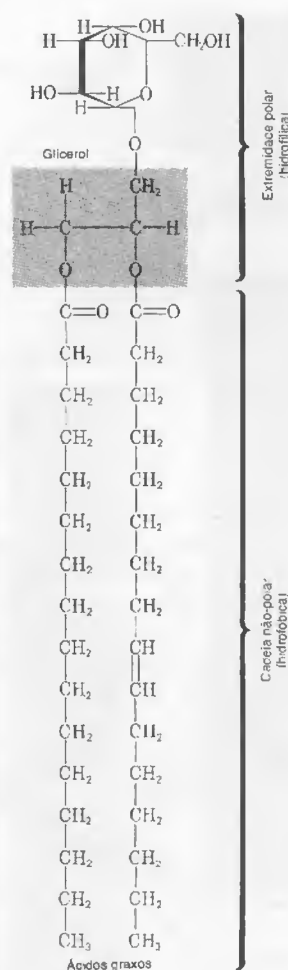


Fig. 3.28 Fórmula da molécula de um glicolipídio.

Polissacarídeos de reserva. Os polissacarídeos de reserva são o **glicogênio** nas células animais e o **amido** na célula das plantas; ambos são polímeros da D-glicose.

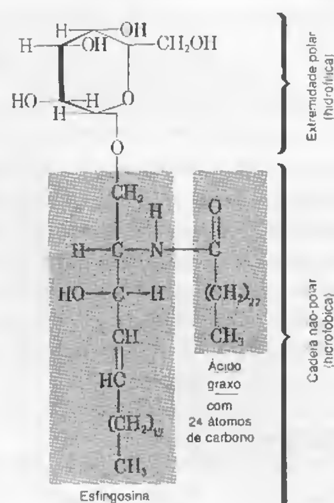


Fig. 3.29 Fórmula da molécula de um cerebrosídeo.

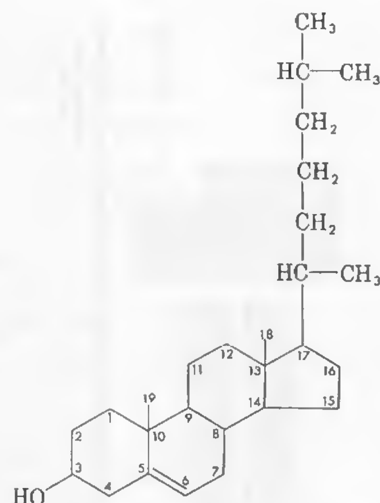


Fig. 3.30 Fórmula da molécula do colesterol. A parte cíclica da molécula é comum a todos os esteróis.

Glicogênio. O glicogênio ocorre no citoplasma das células animais sob a forma de grânulos, com diâmetro de 15 a 30 nm, geralmente dispostos em aglomerados (Fig. 1.12). Os grânulos de glicogênio, além do polissacarídeo, contêm proteínas, inclusive as enzimas responsáveis pela síntese e despolimerização do glicogênio.

A D-glicose recebida em excesso pela célula é adicionada, por processo enzimático, às extremidades da molécula de glicogênio. Nos momentos de necessidade, também por atividade enzimática, libertam-se moléculas de D-glicose, que serão utilizadas para os processos metabólicos da célula. Algumas células, como as do fígado, lançam glicose no sangue, para manter estável a concentração desse açúcar no plasma sanguíneo, o que é de grande importância para as funções dos diversos tecidos do corpo.

A molécula de glicogênio tem dimensões variáveis e é muito ramificada em todas as direções do espaço. A Fig. 3.31 é a sua representação esquemática, em duas dimensões.

Amido. Ao contrário da célula animal, que armazena glicogênio, a célula vegetal tem amido como reserva energética. O amido é composto de dois tipos de moléculas: a **amilose**, um polímero linear, e a **amilopectina**, um polímero ramificado, ambos esses polímeros constituídos por unidades de glicose.

Polissacarídeos estruturais e informacionais. Além dos polissacarídeos de reserva nutritiva (glicogênio e amido), as células sintetizam outros polissacarídeos que se prendem à superfície celular, onde desempenham diversas funções, servindo, em alguns casos, como elementos de sustentação. Combinados com proteínas, esses polissacarídeos fazem parte do glicocálice das células animais, da parede das células bacterianas e da parede das células das plantas. A maioria dos polissacarídeos estruturais e informacionais são **heteropolímeros**. Devido à sua complexidade, a estrutura de muitos deles não foi ainda elucidada. De um modo geral, podem ser divididos em dois grandes grupos: as **glicosaminoglicanas**, que se ligam a proteínas para formar as **proteoglicanas**, e as **glicoproteínas**, cuja estrutura geral será explicada no Cap. 12. A Tabela 3.4 dá uma visão geral da diversidade funcional e estrutural dos principais componentes macromoleculares das células. Os polissacarídeos têm funções energéticas, estruturais e informacionais (glicocálice, hormônios glicoprotéicos).

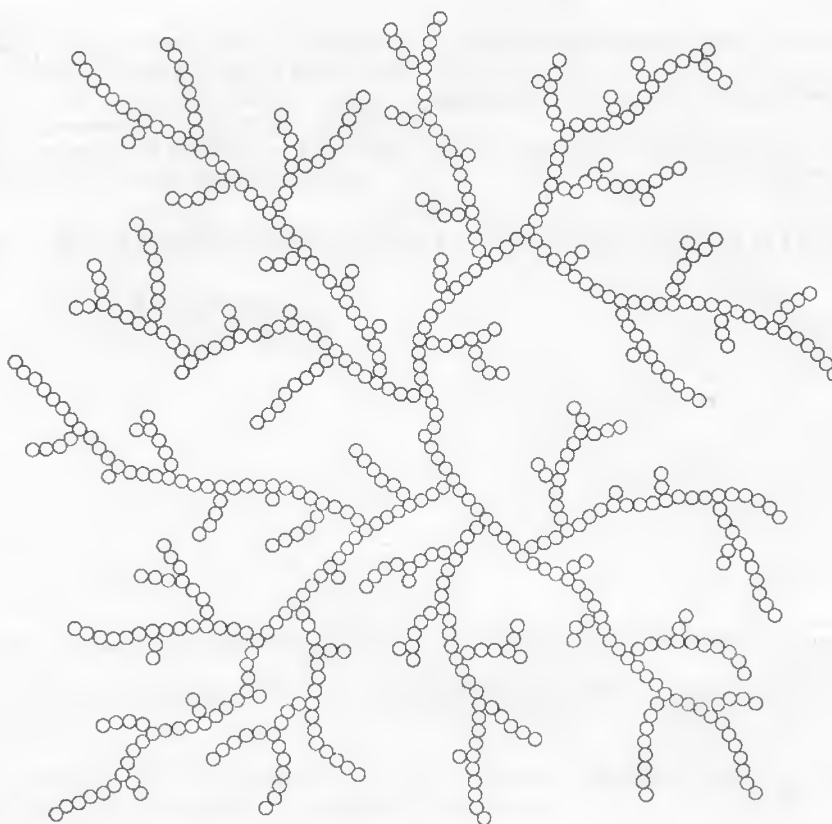


Fig. 3.31 Esquema plano da molécula de glicogênio que, na realidade, ramifica-se em todas as direções do espaço, como os galhos de uma árvore. Cada círculo representa um resíduo de glicose.

Sumário

Existe, nas células, preponderância absoluta dos compostos de carbono, embora eles sejam extremamente raros na litosfera (crosta terrestre). Isto sugere que as primeiras células foram constituídas com estes compostos e que esta seleção foi transmitida às células seguintes, durante o processo evolutivo. As funções vitais dependem da presença de macromoléculas poliméricas *de compostos de carbono. Esses polímeros são constituídos pela associação, em número variável, de unidades ou* monômeros, *que podem ser iguais, nos* homopolímeros, *como o glicogênio, ou diferentes, nos* heteropolímeros, *como os ácidos nucléicos. Os biopolímeros mais importantes são as proteínas, formadas por aminoácidos, os polissacarídeos constituídos de monossacarídeos e os ácidos nucléicos formados por nucleotídeos. É muito comum a associação de macromoléculas para formar complexos como lipoproteínas, glicoproteínas, proteoglicanas e nucleoproteínas (ácidos nucléicos e proteínas).*

A associação entre água e vida é bem conhecida, e toda célula é obviamente rica em água. A molécula de água é um dipolo, *com uma extremidade eletricamente mais negativa (mais rica em elétrons) do que a outra. Por suas propriedades, as moléculas de água influem poderosamente nos processos metabólicos, tendo papel também na configuração espacial das macromoléculas e, portanto, na atividade funcional destas.*

As proteínas têm papel enzimático e participam da estrutura e dos movimentos celulares. O papel dos ácidos nucléicos é principalmente informacional: constituem os genes e são responsáveis pela expressão da informação neles contida. Excepcionalmente, o RNA pode ter atividade enzimática. Os lipídios estão presentes em todas as membranas celulares, onde têm papel estrutural, e, como depósitos citoplasmáticos, representam também reserva nutritiva que é metabolizada para fornecer energia para a célula. Os polissacarídeos em combinação com proteínas têm papel estrutural. Isoladamente são encontrados sob a forma de amido nas células vegetais e de glicogênio nas células animais, representando importante material energético.

Bibliografia

ARMSTRONG, F.B. *Biochemistry.* 3rd ed. Oxford Univ. Press, 1989.

DOOLITTLE, R.F. Proteins, *Sci. Am., 253*(4):88, 1985.

GILBERT, W. The RNA world. *Nature, 319*:618, 1986.

GUERRIER-TAKADA, C. and ALTMAN, S. Catalytic activity of an RNA molecule prepared by transcription in vitro. *Science, 223*:285, 1985.

LEHNINGER, A.L. *Biochemistry. The Molecular Basis of Cell Structure and Function.* 2nd ed. Worth Pub., 1982.

LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., and COX, M.M. *Principles of Biochemistry.* 2nd ed. Worth Pub., 1993.

McGILVERY, R.W. and GOLDSTEIN, G. *Biochemistry. A funcional Approach.* 2nd ed. Saunders, 1979.

MILDVAN, A.S. Mechanism of enzyme action. *Ann. Rev. Biochem., 43*:357, 1974.

MURRAY, R.K. *et al. Harper's Biochemistry.* 22nd ed. Appleton & Lange, 1990.

PERUTZ, M. *Protein Structure: New Approaches to Disease and Therapy.* Freeman, 1992.
SCHWEIGGER, H.G. (ed.) *International Cell Biology.* Springer-Verlag, 1981.
SIGMAN, D.S. and MOOSER, G. Chemical studies of enzyme active sites. *Ann. Rev. Biochem., 44*:889, 1975.
STRYER, L. *Biochemistry.* 3rd ed. Freeman, 1988.
TANFORD, C. The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science, 200*:1012, 1978.
VOET, D. and VOET, J.G. *Biochemistry.* 2nd ed. John Wiley, 1995.
ZAUG, A.J. and CECH, T.R. The intervening sequence RNA of *Tetrahymena* is an enzyme. *Science, 231*:470, 1986.

4 Transformação e Armazenamento de Energia

Roteiro

- *Para realizar suas atividades, as células utilizam a energia acumulada nas ligações químicas dos alimentos.*
- *As células que contêm clorofila (vegetais, alguns protistas, raras bactérias) usam a energia da luz para sintetizar moléculas de nutrientes (fotossíntese).*
- *As moléculas de adenosina-trifosfato (ATP) possuem ligações químicas muito ricas em energia.*
- *A enzima ATPase é abundante nas células. Esta enzima rompe a molécula de ATP, liberando energia e originando ADP e Pi (fosfato inorgânico).*
- *ATP é a principal fonte imediata de energia nas células.*
- *A transferência de energia dos nutrientes para o ATP pode ser feita pela fermentação (anaeróbia), mas este processo retira apenas pequena parte da energia dos nutrientes.*
- *As mitocôndrias possuem a maquinaria para a fosforilação oxidativa (aeróbia), muito eficiente na transferência de energia dos nutrientes para ATP.*
- *A energia dos nutrientes é utilizada para gerar um gradiente de prótons (H^+) entre as duas membranas mitocondriais; esse gradiente produz um fluxo de prótons, cuja energia forma ATP a partir de ADP (teoria quimiosmótica).*
- *Cada mitocôndria contém alguns filamentos circulares de DNA em hélice dupla, que codificam algumas proteínas mitocondriais.*
- *O DNA da mitocôndria é muito compacto, não contém íntrons e caracteriza-se por taxa de mutação muito alta (5 a 10 vezes maior do que a do DNA nuclear).*
- *O código genético do DNA das mitocôndrias é diferente, e a herança mitocondrial é puramente materna.*
- *Os ribosomas e o DNA das mitocôndrias são parecidos com os das bactérias.*
- *Admite-se que, durante a evolução das células, as mitocôndrias se originaram de bactérias endossimbiontes que, no processo evolutivo, transferiram parte de seus genes para o núcleo da célula hospedeira.*

As células eucariontes revelam uma série de características funcionais comuns a todas elas, como, por exemplo, capacidade de multiplicação, de movimentação, irritabilidade, condução de impulsos e secreção. Todas as células apresentam essas atividades, com maior ou menor intensidade, de acordo com suas características especiais. As células musculares, por exemplo, têm capacidade de contração altamente desenvolvida, mas fraca, ou nenhuma, capacidade secretora. Já as células glandulares apresentam intensa atividade secretora, mas quase nenhuma atividade motora. Porém, todas as células precisam de energia para realizar suas atividades básicas e especializadas.

A energia utilizada pelas células eucariontes, tanto animais como vegetais, provém da ruptura gradual de ligações covalentes de moléculas de compostos orgânicos ricos em energia. Na célula vegetal, esses compostos são sintetizados com a energia resultante da transformação de energia solar em energia química durante o processo de fotossíntese (*photon*, luz, e *sintesis*, síntese). Na fotossíntese, graças ao pigmento clorofila, processa-se a acumulação da energia solar sob a forma de ligações químicas nos hidratos de carbono, principalmente hexoses, que se polimerizam para formar amido. As hexoses originadas na fotossíntese são fonte de energia e, também, de carbono em condições de ser utilizado para a síntese de diversas macromoléculas orgânicas.

As células, porém, não usam diretamente a energia liberada dos hidratos de carbono e gorduras, mas se utilizam de um composto intermediário, a **adenosina-trifosfato (ATP)**, geralmente produzido graças à energia contida nas moléculas de glicose e de ácidos graxos.

Os ácidos graxos são, do ponto de vista quantitativo, uma fonte energética muito mais importante do que os carboidratos, pois, peso a peso, rendem muito mais energia do que o glicogênio dos tecidos. Enquanto uma molécula-grama de glicose gera 38 moléculas-grama de ATP, uma de ácido palmítico gera 126 moléculas-grama de ATP. Um homem adulto tem energia depositada em glicogênio suficiente para apenas um dia, mas suficiente gordura para um mês.

O ATP, cuja fórmula está representada na Fig. 4.1, tem duas ligações ricas em energia (representadas pelo sinal ~); quando uma delas se rompe, libera aproximadamente 10 quilocalorias por molécula-grama. Geralmente, apenas uma ligação é rompida, segundo a equação ATP → ADP + Pi + energia (Pi significa fosfato inorgânico, e ADP, adenosina-difosfato).

O citoplasma contém energia acumulada nos depósitos de moléculas de triacilglicerídeos (gorduras neutras), de moléculas de glicogênio e, também, sob a forma de compostos intermediários (metabólitos) ricos em energia, dos quais o principal é o ATP. Os triacilglicerídeos e o glicogênio representam acúmulo de energia sob forma estável e concentrada, mas dificilmente acessível, ao passo que o ATP é um composto instável, que não contém energia tão concentrada, mas facilmente utilizável porque a enzima que rompe a molécula de ATP (ATPase) é muito abundante na célula. A decomposição da glicose em água e gás carbônico, que ocorre durante a respiração celular, rende 690 kcal/mol, enquanto a hidrólise das duas ligações ricas em energia do ATP rende somente 20 kcal/mol. Hidratos de carbono e gorduras podem ser comparados a dinheiro no banco, e ATP a dinheiro no bolso. De fato, o dinheiro depositado no banco é estável (teoricamente, não sujeito a roubo ou perdas) e pode ser acumulado em grandes somas. Já o dinheiro do bolso (ATP) é instável, só se pode guardá-lo em quantidades limitadas, mas é facilmente acessível quando necessário.

Tabela 4.1

Composto	kcal/mol
Pirofosfato	6,0
Acetilcoenzima A	6,3
Adenosina-difosfato (ADP)	6,5
Acetilfosfato	8,7
S-fosforilcoenzima A	9,0
Fosfocreatina	9,8
Adenosina-trifosfato (ATP)	10,0
Glicerilfosfato	11,3
Fosfoenolpiruvato	12,4
Acetiladenilato	13,0
Adenosina-fosfossulfato	18,0

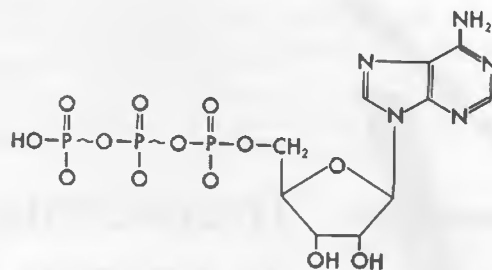
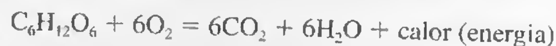


Fig. 4.1 Fórmula do trifosfato de adenosina, abreviadamente chamado ATP. O símbolo ~ indica as ligações químicas que são muito ricas em energia.

A queima da glicose libera uma quantidade certa de energia e consome oxigênio. O resultado dessa operação, que pode ser realizada num aparelho chamado **calorímetro**, produz calor (690 kcal/mol), água e gás carbônico, segundo a equação:



$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 = 6CO_2 + 6H_2O + \text{calor (energia)}$$

Essa combustão da glicose é, porém, um processo violento que leva o calorímetro rapidamente a altas temperaturas. Se isso ocorresse dentro de uma célula, ela se queimaria instantaneamente.

Percebe-se, portanto, por que, para retirar a energia dos nutrientes, a célula desenvolveu um sistema que os oxida lentamente, liberando energia gradualmente, e produzindo água e CO_2. A esse processo, chamou-se **respiração celular**, e coube aos gênios de Lavoisier e Laplace definir a respiração como "um tipo de combustão, muito lenta, mas não obstante inteiramente análoga à do carvão".

As células utilizam dois mecanismos para retirar energia dos nutrientes: a **glicólise anaeróbia** e a **fosforilação oxidativa.**

A glicólise anaeróbia produz apenas 2 moles de ATP por cada mol de glicose

A glicólise anaeróbia é o processo pelo qual uma seqüência de aproximadamente 11 enzimas do citosol ou matriz citoplasmática promovem uma série de transformações graduais numa molécula de glicose, sem consumo de oxigênio, produzindo duas moléculas de piruvato e liberando energia que é armazenada em duas moléculas de ATP. O ATP se forma a partir do ADP e do fosfato inorgânico (Pi) existentes no citosol, segundo a equação:



$$2\ ADP + 2\ Pi + \text{energia da glicose} \rightarrow 2\ ATP$$

Nesse processo, a célula armazena 20 kcal para cada molécula-grama de glicose degradada. Essa degradação da glicose não necessita de oxigênio, razão pela qual é chamada de **glicólise anaeróbia** ou **fermentação**. No lêvedo de cerveja, em condições anaeróbias, a glicólise prossegue, transformando-se o piruvato em etanol após uma série de reações enzimáticas. A fermentação fornece ao lêvedo de cerveja a energia necessária para sua manutenção e reprodução, sendo designado por **fermentação alcoólica**, porque o produto final é o álcool etílico.

A glicólise é, do ponto de vista de rendimento energético, um processo pouco eficiente, pois, das 690 kcal/mol presentes na glicose, apenas 20 são aproveitadas. Como a glicólise é um processo rudimentar, as células desenvolveram, ao longo da evolução, mecanismos mais eficazes de extração de energia.

Graças à fosforilação oxidativa, cada mol de glicose produz 36 moles de ATP

Após o aparecimento do oxigênio na atmosfera, desenvolveu-se uma nova via metabólica de maior rendimento energético do que a glicólise: a **fosforilação oxidativa.**

Na fosforilação oxidativa, o piruvato é oxidado até se formarem água e gás carbônico, com alto rendimento energético. Costuma-se distinguir, na oxidação fosforilativa, três mecanismos distintos, mas que se entrelaçam intimamente; são eles a **produção de acetilcoenzima A (acetil-CoA)**, o **ciclo do ácido cítrico** e o **sistema transportador de elétrons**.

Enquanto a glicólise ocorre no citosol, a fosforilação oxidativa se processa no interior das mitocôndrias (Fig. 4.2).

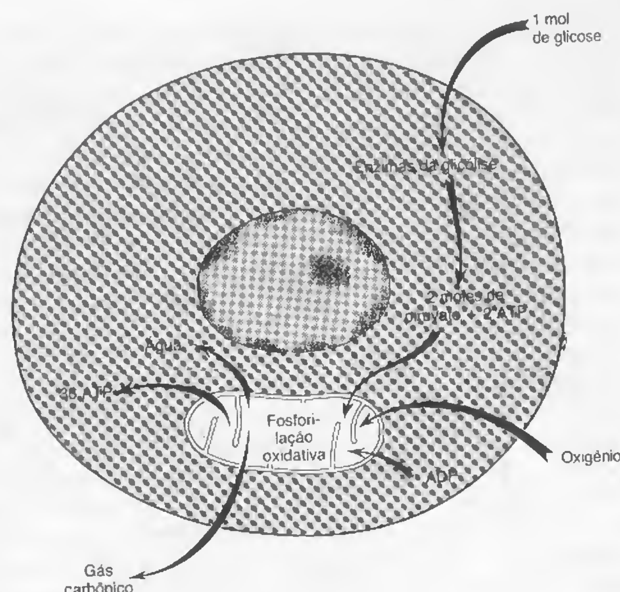


Fig. 4.2 Desenho esquemático, mostrando que a glicólise ocorre na matriz citoplasmática, enquanto a produção de acetilcoenzima A e a oxidação fosforilativa se processam dentro das mitocôndrias. A maior produção de ATP se dá na mitocôndria, devido à oxidação dos substratos oriundos dos nutrientes, com consumo de oxigênio e formação de água e CO_2 (respiração aeróbia) contrastando com a glicólise (respiração anaeróbia), que não consome oxigênio e produz pouco ATP.

Produção de acetilcoenzima A

A acetil-CoA é produzida a partir da coenzima A e do piruvato derivado da glicólise ou, então, por oxidação dos ácidos graxos. Piruvato e ácidos graxos atravessam as membranas mitocondriais e, na matriz da organela, geram acetato que, ligado à coenzima A, forma acetil-CoA.

A transformação de piruvato em acetil-CoA deve-se a um sistema multienzimático, **o complexo desidrogenase do piruvato**, constituído de cópias múltiplas de três enzimas, cinco coenzimas e duas proteínas reguladoras. Esse complexo converte o piruvato em acetil-CoA, liberando CO_2, que é eliminado da mitocôndria. A acetil-CoA entra no ciclo do ácido cítrico.

Ciclo do ácido cítrico

Este ciclo, também chamado de ciclo de Krebs ou **ciclo dos ácidos tricarboxílicos**, é uma seqüência cíclica de reações enzimáticas na qual ocorre, graças à presença das enzimas chamadas desidrogenases, a produção gradual de elétrons e prótons. Os elétrons não são liberados, mas são captados por moléculas complexas como o NAD (**n**icotinamida-**a**denina-**d**inucleotídeo), o FAD (**f**lavina **a**denina **d**inucleotídeo) e os citocromos, que funcionam como transportadores de elétrons, no processo de oxidorredução. O hidrogênio, resultante das reações, é liberado na matriz mitocondrial, sob a forma de prótons (H^+).

O ciclo do ácido cítrico tem início com a condensação da acetil-CoA com ácido oxalacético, produzindo ácido cítrico. Este sofre uma série de modificações e acaba produzindo ácido oxalacético, que, por sua vez, recomeça o ciclo. O resultado final do ciclo do ácido cítrico é o seguinte: graças às desidrogenases, ocorre a produção de hidrogênio, que dará prótons e elétrons. Descarboxilases levam à produção de CO_2, e existe uma reação exoenergética que promove a síntese de duas moléculas-grama de ATP por molécula-grama de glicose consumida (Fig. 4.3). A função principal do ciclo do ácido cítrico é, portanto, produzir elétrons com alta energia e prótons, gerando CO_2. Seu rendimento energético é baixo.

Além dessas funções, o ciclo do ácido cítrico fornece metabólitos que serão usados para a síntese de aminoácidos e hidratos de carbono.

O sistema transportador de elétrons

É uma cadeia, formada por enzimas e compostos não-enzimáticos, cuja função é transportar elétrons. Vários desses transportadores de elétrons são ricos em ferro e constituem os **citocromos**. Ao longo dessa cadeia, são transportados elétrons de alta energia que vão gradualmente cedendo essa energia, que é veiculada para três lugares determinados da cadeia, onde ocorre a síntese de ATP. Esse processo é eficiente e produz 36 moléculas de ATP por molécula de glicose consumida.

Existem, ao longo da cadeia de oxidação fosforilativa, 3 sítios nos quais a energia liberada pela oxidação é gradualmente transferida para o ATP graças à fosforilação do ADP. Nesses locais da cadeia, ocorre o acoplamento da liberação de energia, com o seu armazenamento por fosforilação. Existem moléculas tóxicas, como o dinitrofenol, que desacoplam essa transferência de energia, bloqueando a síntese de ATP e dissipando, sob a forma de calor, a energia que seria acumulada no ATP.

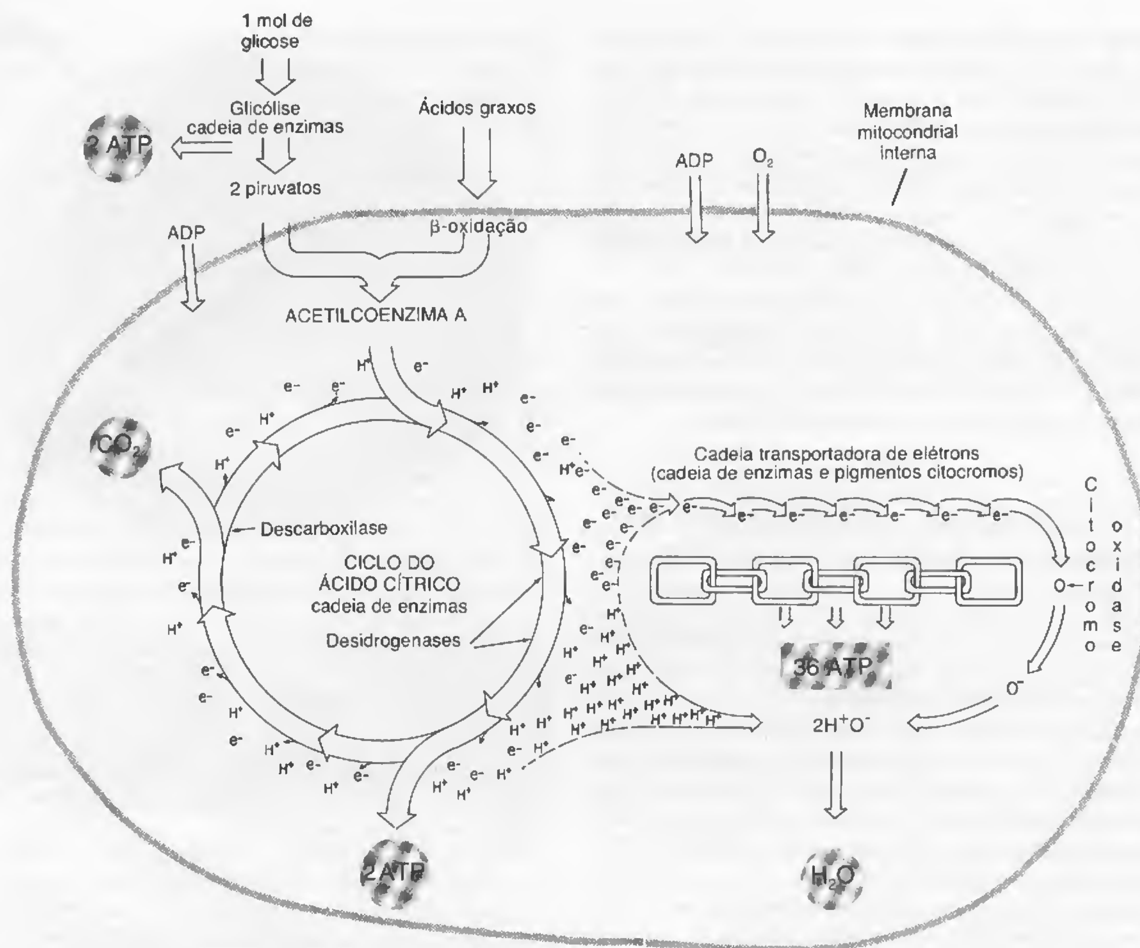


Fig. 4.3 Desenho ilustrando os principais processos que ocorrem na respiração celular aeróbia. A linha cinza indica os limites de uma mitocôndria. Inicialmente, ocorre a produção de acetilcoenzima A, que entra no ciclo do ácido cítrico, do qual resulta a produção de elétrons, prótons, CO_2 e pequena quantidade de ATP. Os elétrons percorrem a cadeia transportadora de elétrons e produzem muito ATP. Os prótons combinam-se com o oxigênio, ativado pelo sistema citocromo-oxidase, produzindo água. Observe que, no citosol, 1 mol de glicose produz 2 moles de ATP, ficando muita energia nas moléculas de piruvato. Esse piruvato entra na mitocôndria, onde o restante da energia do mol inicial de glicose é transferida para cerca de 38 moles de ATP. Portanto, a mitocôndria aumenta muito a capacidade celular de aproveitar a energia contida nos nutrientes. Observe, ainda, a entrada de oxigênio e ADP (adenosina-difosfato) na mitocôndria. O desenho não mostra, mas a mitocôndria necessita também de Pi (fosfato inorgânico) para que o ADP seja transformado em ATP.

Ao chegarem ao fim do sistema transportador, os elétrons ativam moléculas de oxigênio, produzindo O^- graças a um sistema enzimático aí existente, chamado **citocromo-oxidase**. Esse oxigênio com um elétron a mais combina-se com os prótons, produzindo água (Fig. 4.3). A citocromo-oxidase é fortemente inibida pelo cianeto, razão pela qual esse composto é um tóxico muito violento.

Portanto, a respiração celular aeróbia produz CO_2, H_2O e energia (calor) segundo a equação global.



$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + \text{energia}$$

Como na mitocôndria o consumo de oxigênio está relacionado à fosforilação de ADP, o processo recebeu o nome de **oxidação fosforilativa**.

Do ponto de vista de rendimento energético, a mitocôndria apresenta-se como uma máquina altamente eficiente. Calcula-se que, aproximadamente, a metade da energia liberada dos nutrientes é armazenada pelas mitocôndrias em moléculas de ATP. Os outros 50% são dissipados sob forma de calor, que é utilizado nos seres homeotérmicos para manter constante a temperatura corporal.

Em conclusão, o processo de oxidação fosforilativa é de alto rendimento energético, quando comparado à glicólise. Certos indícios fazem supor que a glicólise seja o processo que filogeneticamente apareceu primeiro e que a oxidação fosforilativa se desenvolveu depois, durante a evolução, como um aperfeiçoamento do processo de respiração.

Via das pentoses e glicogenossíntese

A **via das pentoses** é constituída por uma seqüência enzimática com várias etapas, começando na glicose 6-fosfato, presente no início da glicólise, e levando à produção do açúcar ribose,

que é uma pentose utilizada para a síntese das moléculas dos ácidos nucléicos. Ao longo dessa via ocorre também a redução da coenzima NADP para NADPH.

A **glicogenossíntese** é o processo pelo qual a glicose é polimerizada para formar glicogênio, que é acumulado no citoplasma em quantidades variáveis de acordo com o tipo celular, funcionando como depósito de energia. Em determinadas células, como nas do fígado e músculo, esse processo pode ser intenso e ocorrem extensos depósitos de glicogênio. O glicogênio hepático que chega a 150 g é degradado no intervalo das refeições mantendo constante o nível de glicose no sangue e, assim, fornecendo essa molécula energética para as outras células do organismo. O glicogênio das células musculares, ao contrário, forma glicose apenas para a contração muscular.

Sendo produtores de ATP, as mitocôndrias se localizam próximo aos locais que necessitam de energia

As mitocôndrias (*mitos*, filamento, e *condria*, partícula) são organelas de forma arredondada ou alongada, presentes no citoplasma das células eucariontes, e que exercem importante função na respiração aeróbia.

Essas organelas possuem um diâmetro aproximado de 0,5 a 1,0 µm, variando o comprimento desde 0,5 µm até 8 ou 10 µm. A forma e a posição das mitocôndrias não são fixas, pois foi observado, nas culturas de células, que as organelas se movem constantemente. Os movimentos e a posição intracelular das mitocôndrias são influenciados pela disposição do citoesqueleto, e, de modo geral, observa-se estreita relação entre essas organelas e as necessidades energéticas da célula. Células que consomem muita energia, como as musculares, têm muitas mitocôndrias. Já os fibroblastos e linfócitos têm poucas mitocôndrias, coincidindo com uma respiração de baixa intensidade. Essa relação é tão acentuada, que se pode estabelecer uma correlação entre o consumo de O_2 por unidade de peso de um tecido (chamado de QO_2) e a quantidade de mitocôndrias que as suas células contêm. As mitocôndrias geralmente se localizam dentro da célula, próximo aos locais onde existe grande consumo de energia. Nos epitélios ciliados, as mitocôndrias se acumulam perto dos cílios e, nos espermatozóides, ao redor da porção inicial do flagelo, onde tem início a movimentação flagelar. Nas células musculares estriadas, elas se dispõem paralelamente, entre os feixes de miofibrilas (Fig. 4.4). Outros exemplos são os acúmulos de mitocôndrias encontrados nas células sensitivas da retina (Fig. 4.5) e nas células que transportam íons, como, por exemplo, as dos túbulos do rim (Fig. 4.6) e as células parietais do estômago.

As mitocôndrias são de constituição lipoprotéica, sendo, em média, três quartos do seu peso seco constituídos por proteínas e um quarto por lipídios. Os lipídios estão presentes, principalmente, nas membranas mitocondriais. Contêm também pequena

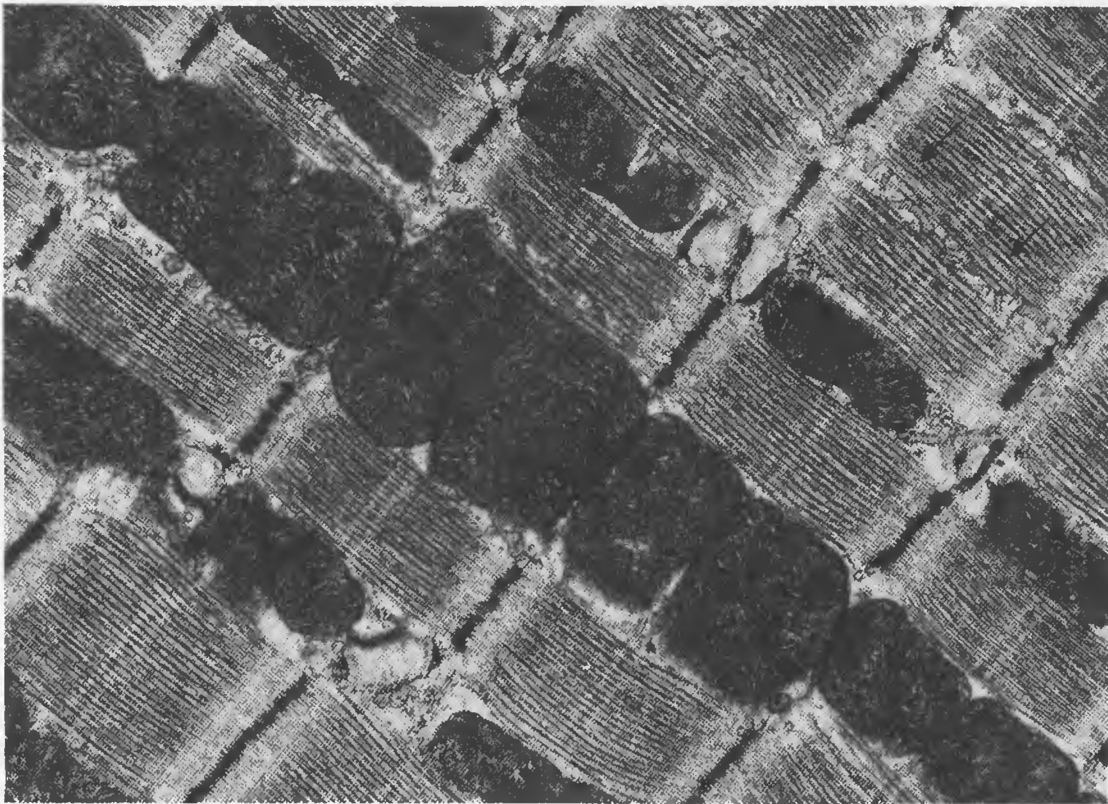


Fig. 4.4 Eletromicrografia de músculo cardíaco de macaco, um tecido que necessita de muitas mitocôndrias porque consome muito ATP, que é a fonte de energia para a contração muscular. Observe a disposição das mitocôndrias, formando um trajeto paralelo às miofibrilas. Observe, também, que as mitocôndrias são ricas em cristas e que a matriz mitocondrial é densa aos elétrons (aparece escura na micrografia). 30.000 ×.

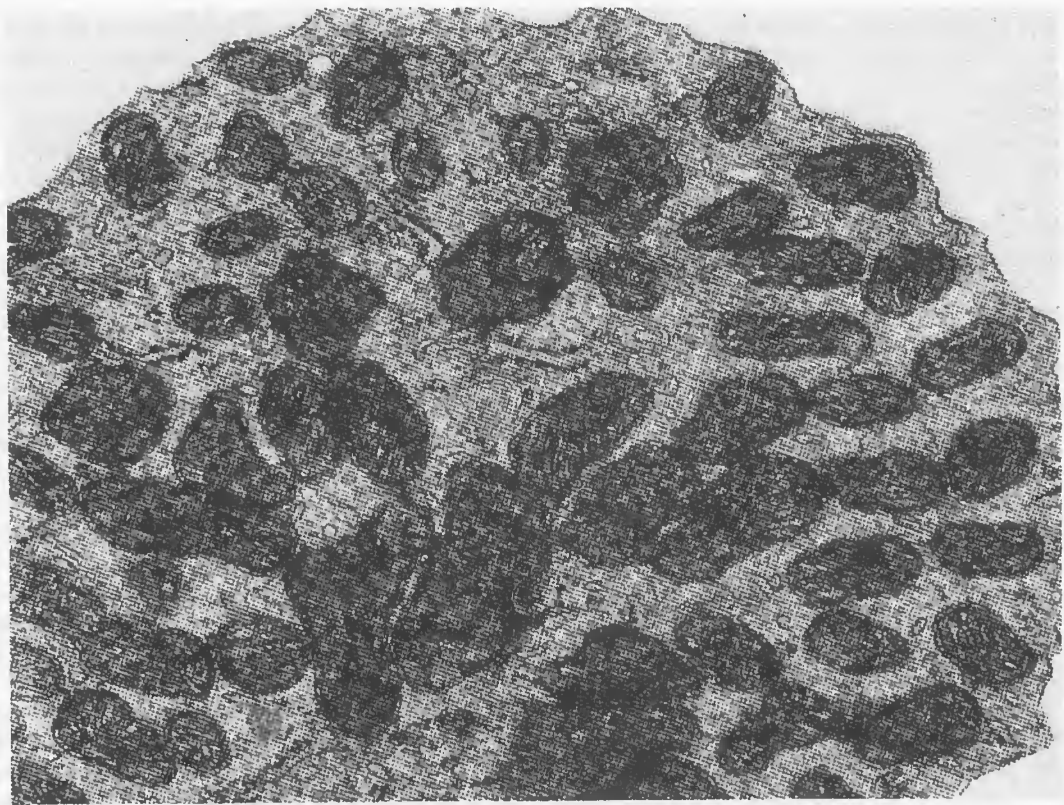


Fig. 4.5 Eletromicrografia de célula da retina de macaco, em região onde ocorre um acúmulo de mitocôndrias. Observar que as mitocôndrias contêm muitas cristas e apresentam matriz densa aos elétrons (aparece escura na micrografia). 50.000 ×.

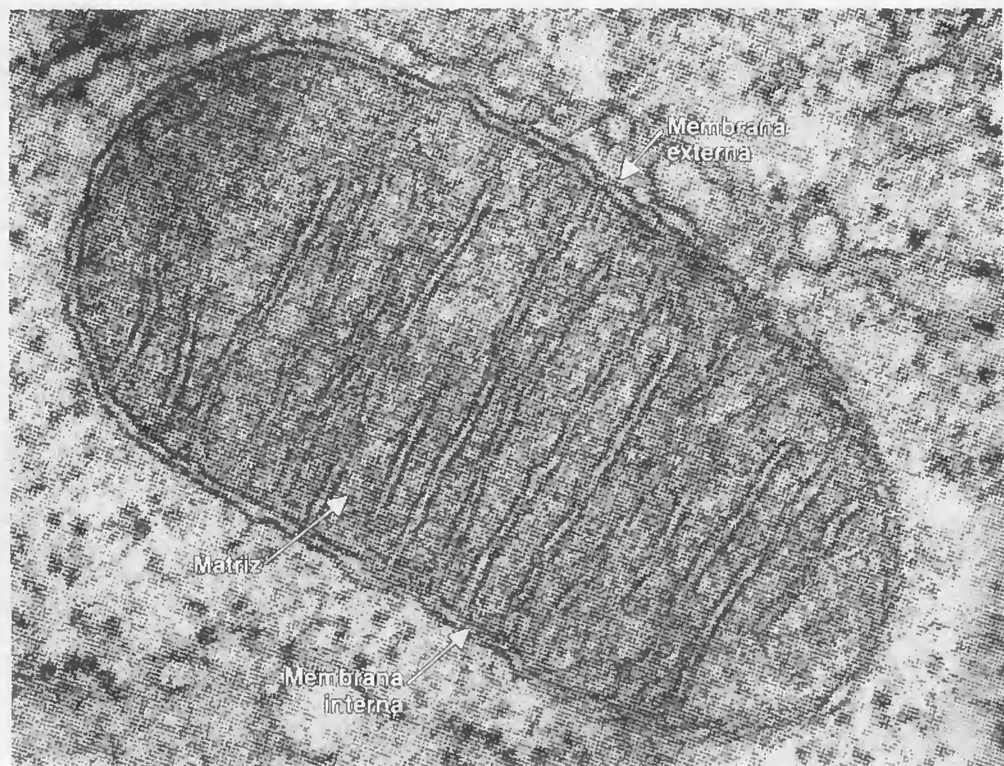


Fig. 4.6 Eletromicrografia de mitocôndria de célula renal de camundongo. Notar a dupla membrana e as cristas, numerosas, mas menos freqüentes do que no músculo estriado cardíaco (comparar com a Fig. 4.4). A matriz, de aspecto granuloso, preenche o espaço entre as cristas. 84.000 ×.

quantidade de DNA e das três variedades de RNA (mRNA, tRNA e rRNA).

A maior parte dos lipídios é formada por fosfolipídios, sendo o restante constituído por triacilglicerídeos e colesterol. As proteínas são, em maior parte, enzimas, das quais se conhecem mais de 70; isto inclui todas as do ciclo do ácido cítrico e as da β-oxidação dos lipídios. Além disso, as mitocôndrias contêm enzimas relacionadas com a síntese de proteínas, transaminação de aminoácidos, síntese de hormônios esteróides e com outros processos metabólicos. Embora o papel energético das mitocôndrias seja importante e, por isso, muito enfatizado, na verdade as mitocôndrias participam de muitas outras funções celulares.

Ultra-estrutura e organização funcional das mitocôndrias

As mitocôndrias apresentam-se envoltas por duas membranas contendo no seu interior a **matriz mitocondrial**. A membrana externa é lisa e muito permeável a diversos tipos de moléculas com peso abaixo de 5.000 dáltons. Essa permeabilidade é devida à presença de proteínas intercaladas na membrana, as **porinas**, que limitam canais com o diâmetro de 1 nm. Entre as duas membranas, observa-se o **espaço intermembranoso**. A membrana interna é rica em enzimas, funcionalmente muito ativa e seleciona, de modo eficiente, as moléculas e íons que a atravessam, facilitando a penetração de certas substâncias e impedindo a penetração de outras. Além das diferenças entre as proteínas das duas membranas, a membrana externa é rica em colesterol, enquanto a membrana interna é pobre neste lipídio, sendo rica em **cardiolipina**, fosfolipídio com quatro ácidos graxos, que não existe na membrana externa. A cardiolipina contribui para dificultar a passagem de íons através da membrana mitocondrial interna, o que é funcionalmente muito importante, porque uma concentração elevada de íons, na matriz da mitocôndria, perturbaria o gradiente que gera o fluxo de prótons e a captação de energia no ATP, pelo processo quimiosmótico.

A constituição molecular das duas membranas das mitocôndrias está em acordo com a possível origem evolutiva dessas organelas a partir de bactérias simbiontes, que se instalaram no citoplasma. A membrana mitocondrial externa é parecida com a membrana plasmática das células eucariontes, e é muito sensível aos detergentes e ao ultra-som, propriedade que tem sido utilizada para romper a membrana externa e isolar, por centrifugação fracionada, as diversas partes das mitocôndrias, conforme será visto adiante. A membrana interna tem muita semelhança com a membrana das bactérias e, como estas, contém o sistema de transferência de energia.

Os fosfolipídios das membranas mitocondriais não são sintetizados na organela, mas sim no retículo endoplasmático. As moléculas de fosfolipídios são transferidas para as mitocôndrias por proteínas transportadoras especiais, que carregam os lipídios de uma membrana muito rica nestas moléculas (retículo endoplasmático) para a membrana de organelas que estão com menor concentração lipídica. As mitocôndrias recebem fosfolipídios por processo semelhante ao descrito com relação aos peroxisomas. A diferença é que as mitocôndrias, embora inca-

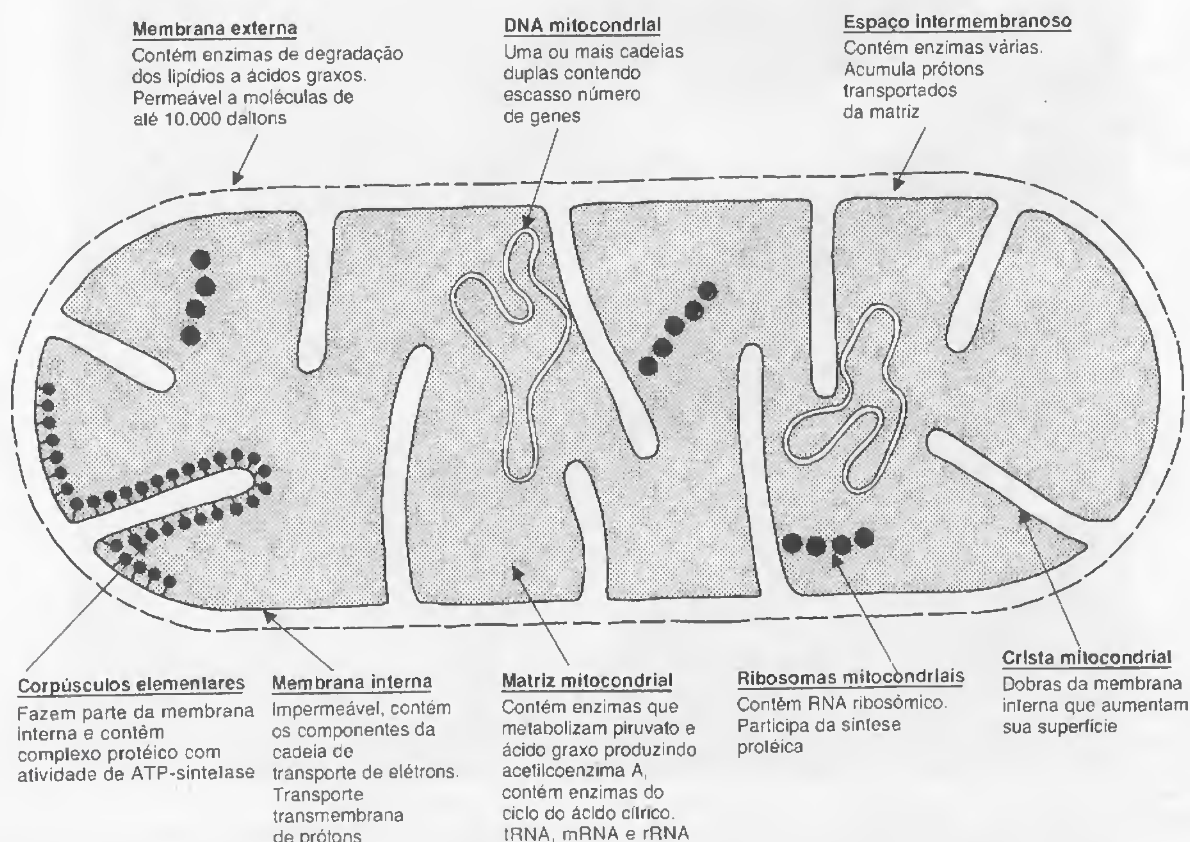


Fig. 4.7 Desenho esquemático apresentando um resumo dos principais componentes mitocondriais e suas funções.

pazes de sintetizar fosfolipídios, exercem um papel funcionalmente significativo, modificando as moléculas recebidas pela via das proteínas transportadoras.

A membrana interna apresenta invaginações em forma de prateleiras, formando as **cristas,** que aumentam grandemente a superfície dessa membrana (Figs. 4.6 e 4.7). Em certos protozoários e em células que sintetizam esteróides, as invaginações da membrana interna assumem a forma de tubos ou dedos de luva, o que leva ao aparecimento de estruturas circulares no interior das mitocôndrias, quando observadas em corte (Fig. 4.8). Uma mesma mitocôndria pode apresentar cristas em prateleiras e invaginações tubulares.

Na superfície interna (em contato com a matriz mitocondrial) da membrana interna da mitocôndria, existem pequenas partículas, em forma de raqueta, e que se inserem pelos seus cabos nessa membrana. São os **corpúsculos elementares**, que têm 10 nm de diâmetro.

No interior das mitocôndrias, encontra-se uma substância finamente granulosa e elétron-densa (escura nas micrografias eletrônicas) chamada **matriz**. É freqüente observar **grânulos elétron-densos (grânulos densos)** no seio da matriz, com diâmetro de 30 a 50 nm, contendo cálcio e de função pouco conhecida. Além desses componentes, distinguem-se com certa dificuldade, no interior da matriz, regiões filamentosas constituídas por filamentos de DNA. Na matriz mitocondrial existem, em sua maioria presos à membrana interna, ribosomas medindo 15 nm de diâmetro (menores do que os do citosol).

Existe alguma variação na estrutura mitocondrial, conforme o tipo de célula e seu estado funcional. De um modo geral, a quantidade de cristas é proporcional à atividade respiratória da célula; a elétron-densidade da matriz também segue essa relação. Nas células do tecido muscular, por exemplo, encontram-se mitocôndrias extremamente ricas em cristas e com matriz muito densa aos elétrons (Fig. 4.4).

A análise da localização das enzimas, nos componentes das mitocôndrias, foi facilitada pela técnica de ruptura dessas organelas, com detergentes ou ultra-som, e o isolamento das membranas internas, das membranas externas, do conteúdo do espaço intermembranoso e do conteúdo da matriz (Fig. 4.9).

O estudo dessas frações demonstrou que a matriz é um complexo concentrado de centenas de enzimas, entre as quais estão as relacionadas com o ciclo do ácido cítrico, com a β-oxidação de ácidos graxos e com a replicação, transcrição e tradução do DNA mitocondrial.

Na membrana interna encontram-se mais de 60 proteínas com as seguintes funções principais:

1 – enzimas e proteínas que constituem a cadeia de transporte de elétrons.

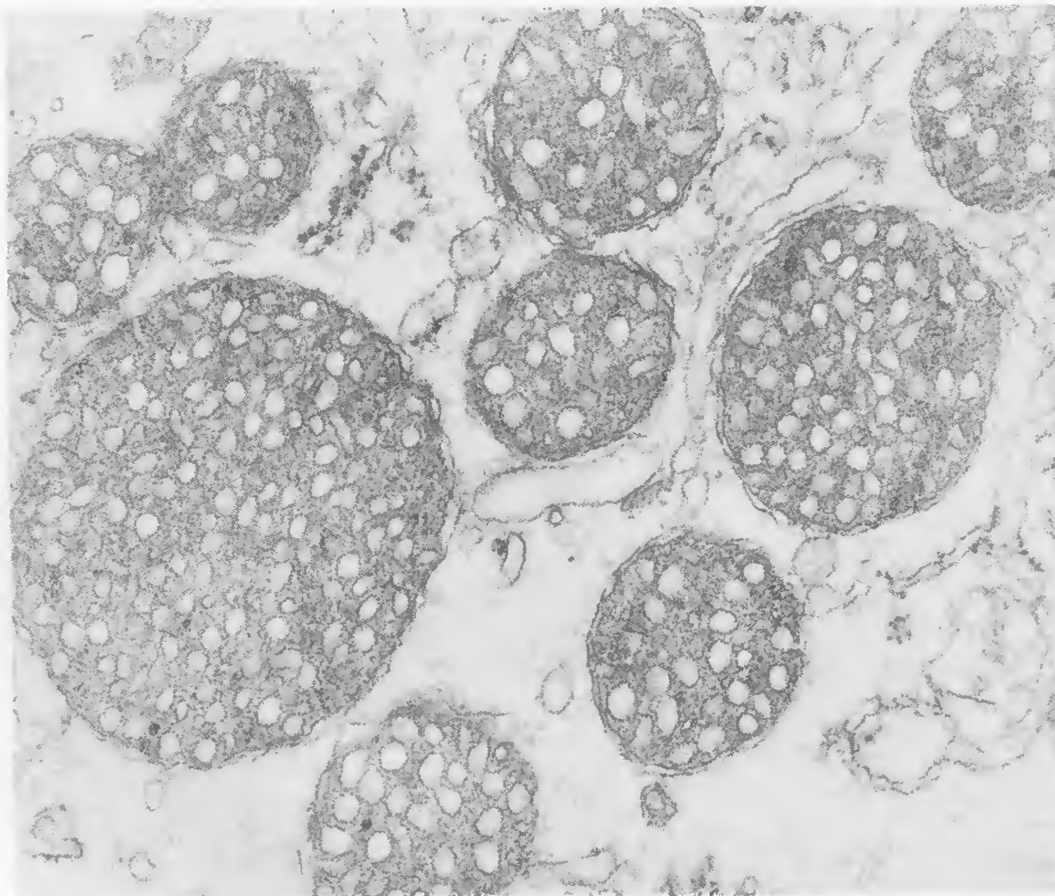


Fig. 4.8 Eletromicrografia mostrando parte do citoplasma de uma célula da camada cortical da glândula adrenal. Observe mitocôndrias contendo, em vez de cristas, invaginações tubulosas de sua membrana interna. Essa disposição é freqüente em células que sintetizam esteróides. 60.000 ×.

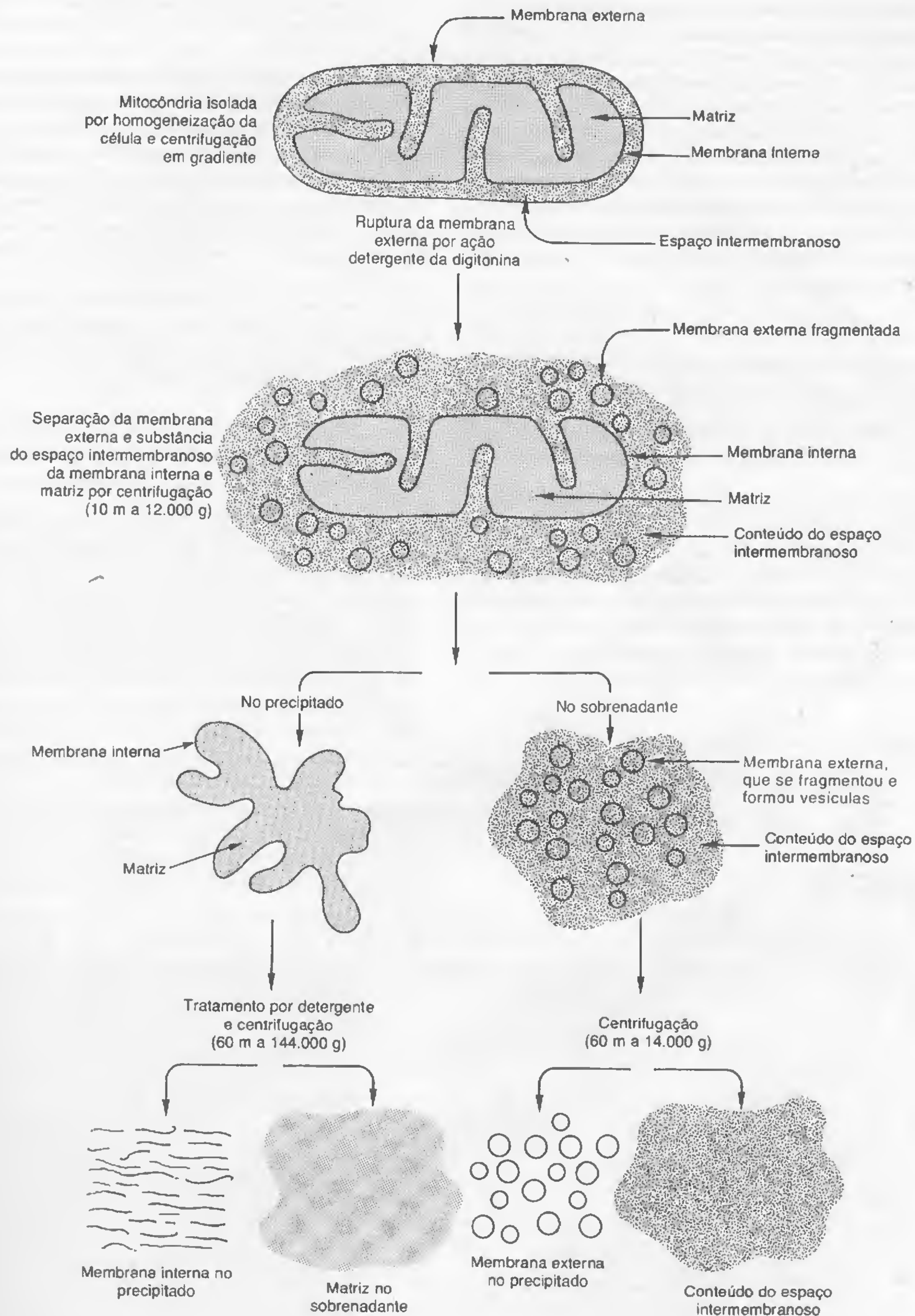


Fig. 4.9 Esquema ilustrando um dos métodos utilizados para fracionar as mitocôndrias. Esse fracionamento é possível porque a membrana mitocondrial externa é muito mais sensível a detergentes e ao ultra-som do que a interna. Essas membranas têm diferenças na constituição molecular. Além de outras diferenças, a membrana interna é rica em cardiolipina (como a membrana das bactérias) e não contém colesterol, enquanto a membrana externa não contém cardiolipina, mas sim colesterol, e pode ser rompida com mais facilidade. A ilustração mostra que, na primeira etapa, apenas a membrana mitocondrial externa é rompida, conservando-se íntegra a membrana interna, que retém a matriz mitocondrial. Posteriormente, a ruptura da membrana interna, graças a novo tratamento com detergente, possibilita a obtenção dessa membrana e da matriz mitocondrial em frações separadas. O processo completo, como mostram os quatro desenhos de baixo, separa quatro frações: a membrana interna, a matriz, a membrana externa e o conteúdo do espaço intermembranoso.

2 – proteínas dos corpúsculos elementares, com atividade de **ATP-sintetase** sem a qual a membrana não teria a capacidade de acoplar o transporte de elétrons à síntese de ATP;

3 – proteínas que fazem parte dos múltiplos sistemas de transporte ativo presentes na membrana interna.

Nas células procariontes (bactérias) não existem mitocôndrias, e a cadeia transportadora de elétrons encontra-se na face interna da membrana plasmática dessas células. Portanto, o fluxo de elétrons e a oxidação fosforilativa estão sempre associados a membranas, e esse é um princípio geral de organização funcional em todos os seres vivos, sejam eles constituídos por células eucariontes ou procariontes.

A transferência de energia para ADP, transformando-o em ATP, deve-se a um processo quimiosmótico

A teoria atualmente aceita, para explicar o acoplamento do processo oxidativo mitocondrial com a síntese de ATP a partir de ADP, é a **teoria quimiosmótica**, segundo a qual os íons H^+ (prótons), produzidos no ciclo do ácido cítrico na matriz mitocondrial, são transportados ativamente através da membrana interna e acumulados no espaço intermembranoso, graças à energia liberada pelos elétrons, durante a sua passagem pela cadeia transportadora de elétrons. A energia do fluxo retrógrado de prótons, através dos corpúsculos elementares, é usada para transformar ADP em ATP. A Fig. 4.10 ilustra a teoria quimiosmótica.

Em um tipo especializado de tecido adiposo, o **tecido adiposo multilocular**, as células apresentam-se ricas em mitocôndrias e contêm inúmeras gotículas de lipídios. Essas células são especializadas na produção de calor, de importância na defesa dos animais contra o frio e no acordar dos animais hibernantes. A produção de calor é muito aumentada nas células do tecido adiposo multilocular, pela presença, nas mitocôndrias, de uma proteína específica, a **termogenina** (*termo*, calor, e *gen*, gerar). Esta proteína permite que os prótons, acumulados no espaço intermembranoso, fluam livremente de volta para a matriz, sem passarem pelos corpúsculos elementares. Conseqüentemente não ocorre síntese de ATP e a energia derivada do fluxo de prótons é dissipada sob a forma de calor (Fig. 4.10).

Transportes de íons e mitocôndrias

O grande acúmulo de mitocôndrias nas células que transportam íons, como é o caso das células dos túbulos contorcidos renais e das células parietais do estômago, está relacionado ao alto dispêndio de energia nos movimentos iônicos, contra um gradiente de concentração, isto é, o transporte de íons de um local de baixa concentração, para um compartimento de alta concentração. Nos dois exemplos citados (células do rim e células parie-

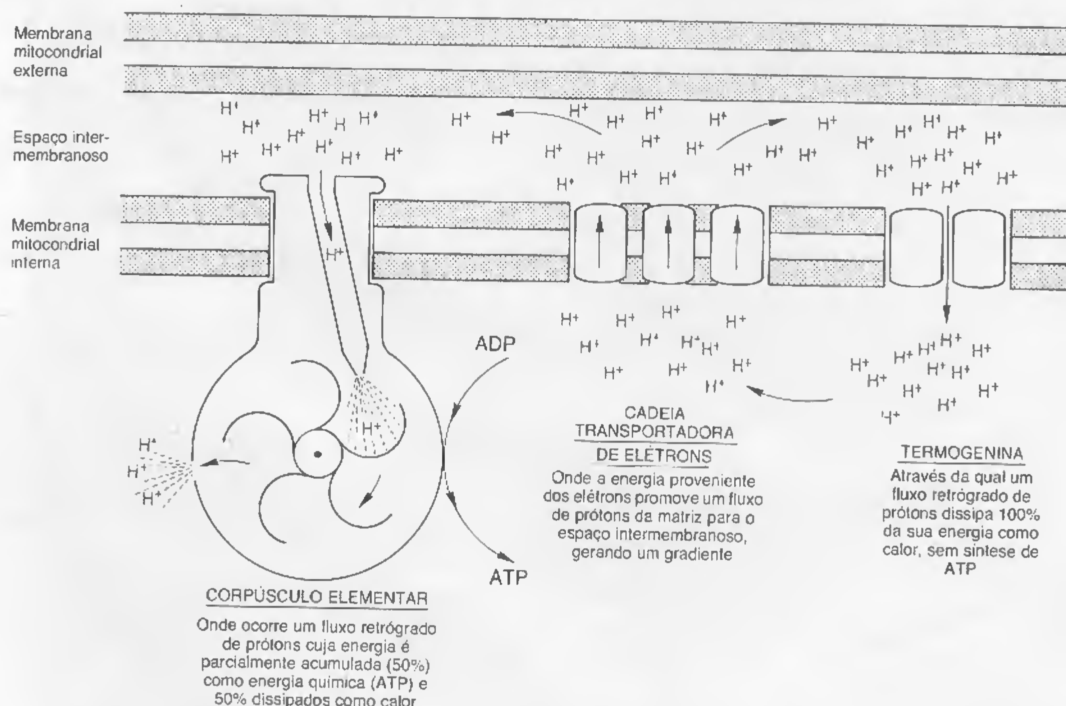


Fig. 4.10 Esquema ilustrando os mecanismos pelos quais a mitocôndria retira energia dos nutrientes, acumulando-a sob a forma de energia química facilmente disponível no ATP. Parte da energia dos nutrientes é, normalmente, dissipada sob a forma de calor. A proteína termogenina pode funcionar como uma espécie de válvula, regulando a quantidade de energia dos nutrientes que vai gerar calor. A termogenina tem papel significativo no despertar dos animais que hibernam, aquecendo o sangue desses animais. O dinitrofenol, substância que inibe a oxidação fosforilativa, é um composto anfipático (prende-se por uma extremidade a uma região hidrofóbica e pela outra a uma região hidrofílica) que desorganiza a estrutura da membrana mitocondrial interna, promovendo um fluxo retrógrado de prótons, sem síntese de ATP.

tais do estômago), os íons são transportados para fora das células, por processo ativo.

Esse acúmulo de mitocôndrias nas células transportadoras de íons está associado a abundantes invaginações da membrana plasmática, o que aumenta consideravelmente a superfície celular por onde tem lugar o transporte. Nestas regiões, verifica-se estreito contato entre as mitocôndrias (produtoras de energia sob a forma de ATP) e as membranas ricas em ATPase, enzima que libera a energia que será utilizada localmente pelas bombas iônicas aí presentes. Trata-se, pois, de uma disposição de alta eficiência energética.

As mitocôndrias apresentam um genoma próprio, embora incompleto

O estudo microscópico de células cultivadas, mostra que as mitocôndrias possuem a capacidade de se dividirem *in vitro*. De outro lado, o estudo bioquímico dessas organelas demonstrou que elas contêm DNA, os três tipos de RNA (rRNA, mRNA e tRNA) e todo o sistema molecular necessário para a síntese de proteínas, independente do citoplasma. De fato, mitocôndrias isoladas, *in vitro*, contêm ribosomas, sintetizam proteínas e são consideradas, devido às características já mencionadas, unidades autoreprodutivas. O DNA das mitocôndrias foi visualizado, isolado e fotografado. Trata-se de um DNA muito compacto, que codifica RNA formado apenas por éxons, sem íntrons, e que tem um código genético próprio, diferente do código genético universal. Outra característica desse DNA é sua origem exclusivamente materna. Praticamente, todas as mitocôndrias do zigoto são de origem materna.

O DNA das mitocôndrias apresenta-se sob a forma de anéis de cadeia dupla, com uma circunferência de 5 a 6 μm (Fig. 4.11). Esse DNA replica-se independentemente do DNA nuclear e da divisão das mitocôndrias. De fato, várias cópias do DNA mitocondrial coexistem na mesma mitocôndria. A função desse DNA é especificar a seqüência de aminoácidos de algumas — mas não de todas — as proteínas mitocondriais, além de produzir os três tipos de RNA (Fig. 4.12). A maior parte das proteínas mitocondriais é sintetizada no citoplasma, em polirribosomas livres, e daí transferidas para as mitocôndrias. As proteínas destinadas às mitocôndrias têm um pequeno segmento da molécula que é um sinal, reconhecido por receptores na superfície das mitocôndrias. Essas proteínas são introduzidas nas mitocôndrias, por processo ativo, com gasto de ATP.

O genoma das mitocôndrias humanas, que é relativamente pequeno, já foi completamente seqüenciado. Ele tem 16.569 nucleotídeos formando 2 genes para rRNA, 22 de tRNA e 13 genes que codificam proteínas, num total de 37 genes, dos quais 24 codificam RNA. Chama a atenção o fato de que o código genético mitocondrial apresenta-se alterado, de modo que 4 dos 64 códons, apresentam significado diferente. Entre as proteínas sintetizadas nas mitocôndrias, citam-se as subunidades da ATP-sintetase, do complexo citocromo bc_1 e a citocromo oxidase.

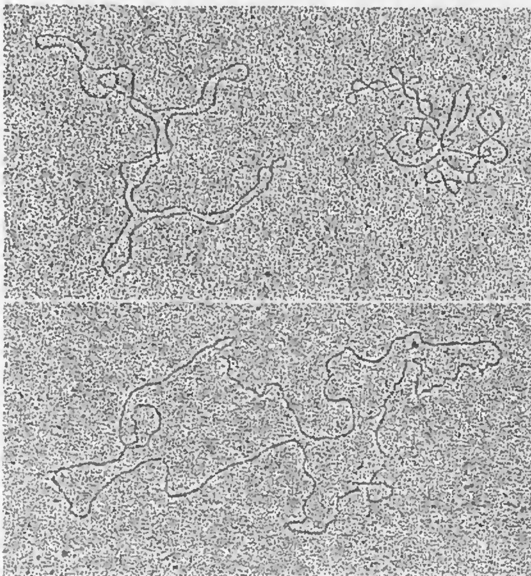


Fig. 4.11 Eletromicrografias de moléculas circulares de DNA, isoladas de mitocôndrias de fibroblastos de camundongo. Em cima, 50.000 × e, embaixo, 40.000 ×. (Cortesia de M.M.K. Nass.)

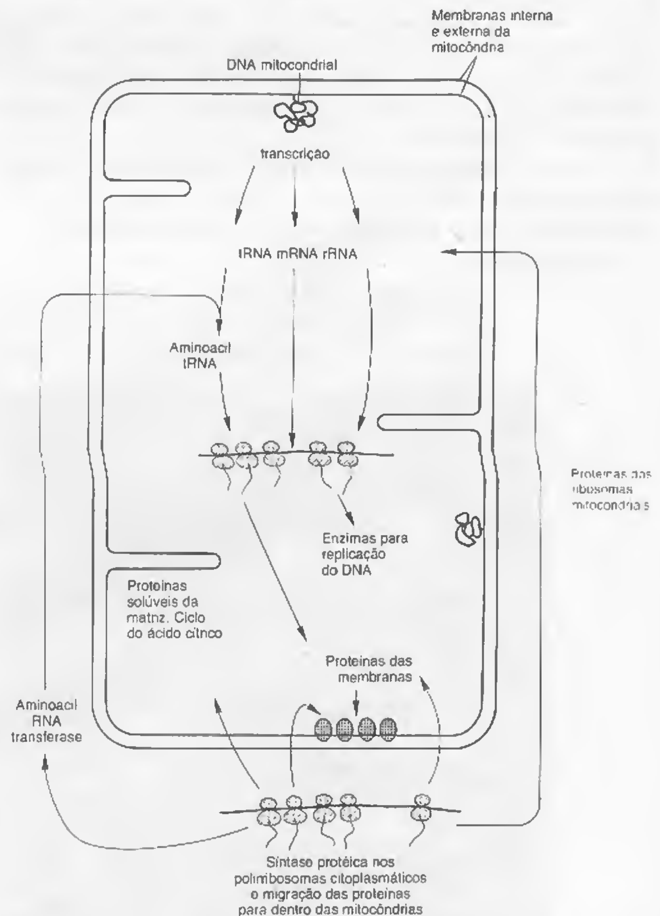


Fig. 4.12 Esquema mostrando que as mitocôndrias têm um sistema genético próprio, porém modesto, que gera proteínas relacionadas com a replicação do seu DNA e algumas proteínas da sua membrana interna. A maioria das outras proteínas mitocondriais (das membranas, da matriz e dos ribosomas) têm origem nos polirribosomas citoplasmáticos. Essas proteínas são sintetizadas com uma pequena seqüência de aminoácidos, ou sinal, que é reconhecido por moléculas da superfície mitocondrial. Em seguida, essas proteínas são introduzidas na mitocôndria.

Origem das mitocôndrias

As presenças de DNA, dos vários tipos de RNA e de um mecanismo de auto-reprodução próprio nas mitocôndrias, além de outros dados, sugerem que as mitocôndrias originaram-se de bactérias aeróbias, que estabeleceram relação simbiótica com células eucariontes anaeróbias nos primórdios da vida na Terra (v. Cap. 1).

Admite-se que, durante o processo evolutivo, as mitocôndrias perderam, gradualmente, a maior parte do seu genoma, que foi transferido para a célula hospedeira. Assim, as mitocôndrias tornaram-se dependentes de proteínas codificadas pelo genoma do núcleo celular.

Outra indicação, muito sugestiva da origem das mitocôndrias a partir de bactérias endossimbiontes, é o fato de que a membrana externa das mitocôndrias é muito semelhante à membrana plasmática das células eucariontes, enquanto a membrana interna é mais semelhante à membrana das bactérias. Essas bactérias teriam penetrado em células eucariontes primordiais por fagocitose, tendo escapado dos mecanismos intracelulares de destruição de células estranhas e estabelecido a endossimbiose. Durante a fagocitose, a membrana plasmática da célula eucarionte hospedeira originou a membrana externa da mitocôndria, e a membrana da bactéria tornou-se a membrana interna da mitocôndria.

A observação de que antibióticos que inibem a síntese protéica bacteriana também agem sobre as mitocôndrias (Fig. 4.13), também fala a favor da origem bacteriana das mitocôndrias.

Ciclo de energia na natureza

A energia acumulada pelas células é utilizada por elas para a manutenção de sua própria estrutura e para o desempenho de suas funções. O ciclo geral de energia na natureza está esquematizado na Fig. 4.14.

As células dos seres **heterotróficos** (*heteros*, outro, e *trophe*, nutrição) utilizam a energia dos alimentos. Nos vegetais **autotróficos** (*autos*, próprio, e *trophe*, nutrição), graças ao processo de fotossíntese, criam-se condições que permitem à própria célula a síntese de seus alimentos. Estes, por sua vez, são utilizados pelas células vegetais e também pelas células animais (Fig. 4.15). A vida na Terra depende da fotossíntese.

Existem doenças por deficiência mitocondrial

Existem várias doenças devido a disfunções mitocondriais, descritas na literatura médica. Serão citados dois exemplos. O primeiro é a doença de Luft, caracterizada por aumento quantitativo das mitocôndrias musculares em pacientes com metabolismo basal elevado, simulando um hipertiroidismo. A análise bioquímica das mitocôndrias desses doentes mostrou que a oxidação fosforilativa está parcialmente desacoplada, explicando a sintomatologia observada. Já a **miopatia mitocondrial infantil**, doença fatal e acompanhada de lesão muscular e disfunção

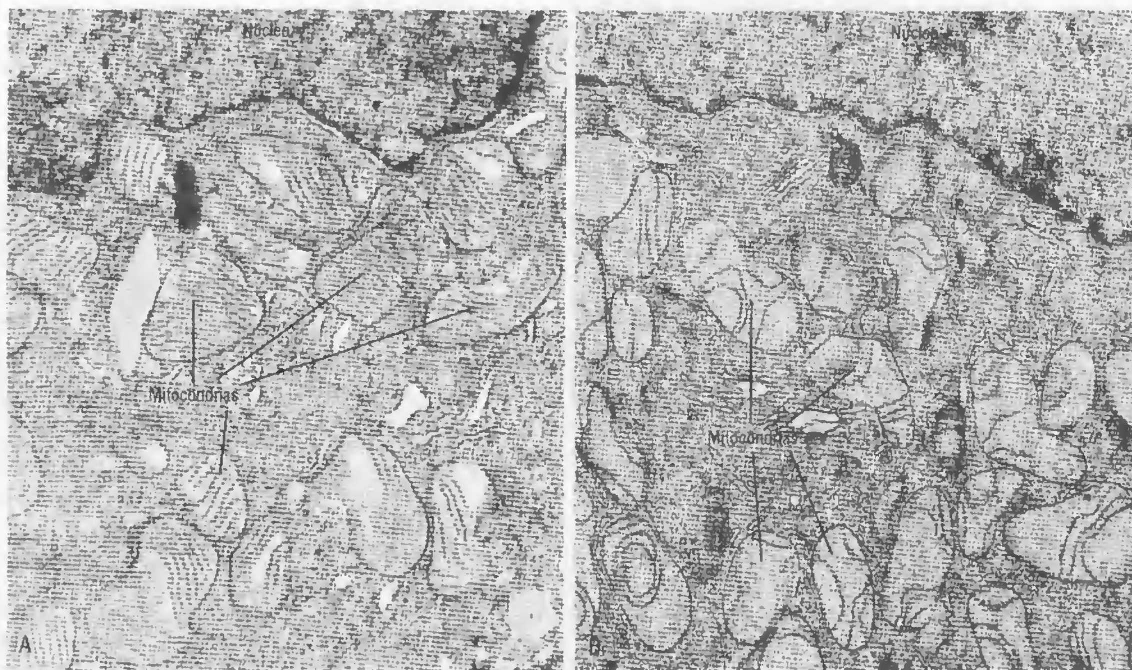


Fig. 4.13 Eletromicrografias de células HeLa cultivadas *in vitro*. Em **A**, célula-controle e, em **B**, após adição, ao meio de cultura, de 50 μg/ml de cloranfenicol. Esse antibiótico inibe a síntese protéica nos ribosomas das bactérias (células procariontes) e das mitocôndrias. Observe, na eletromicrografia **B**, que o antibiótico provocou uma diminuição na quantidade de cristas das mitocôndrias. **A**, aumento 15.000 ×. **B**, aumento 22.000 ×. (Cortesia de R. Lank, e S. Penman. *J. Cell. Biol.*, *49*:541, 1971. Reprodução autorizada.)

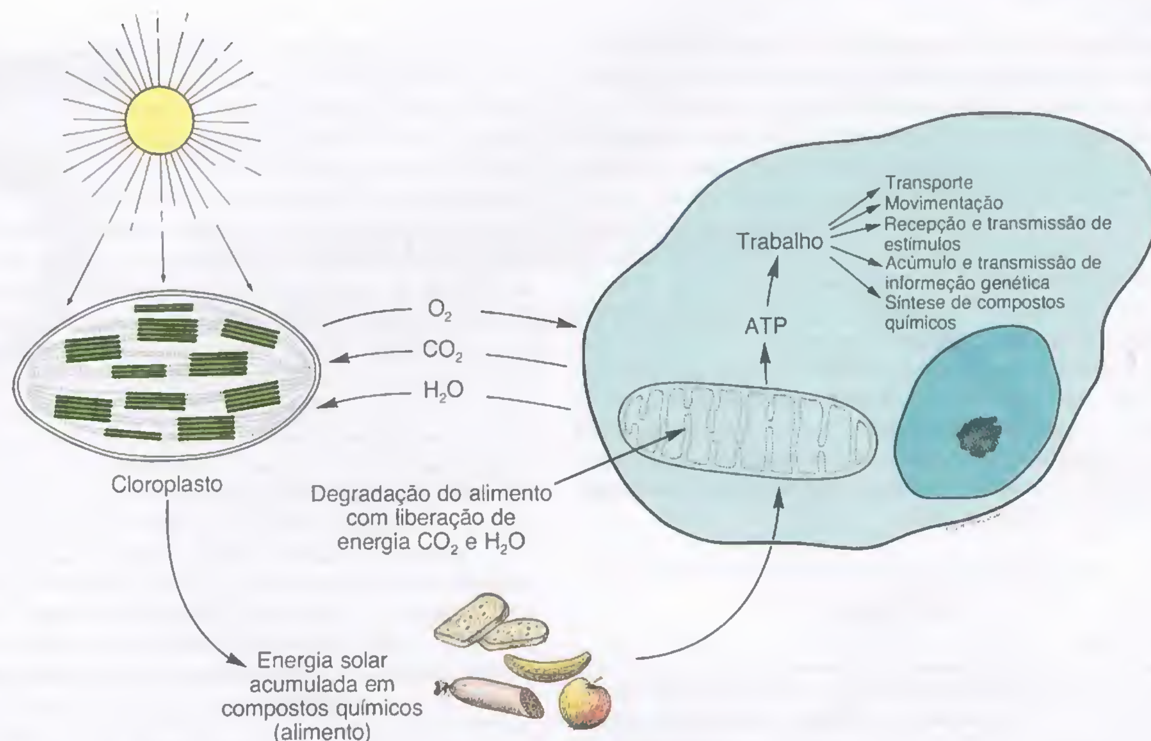


Fig. 4.14 Desenho ilustrando a captação de energia pela fotossíntese, seu acúmulo nos alimentos e a utilização pelas células a fim de realizar as suas funções (ciclo de energia na natureza).

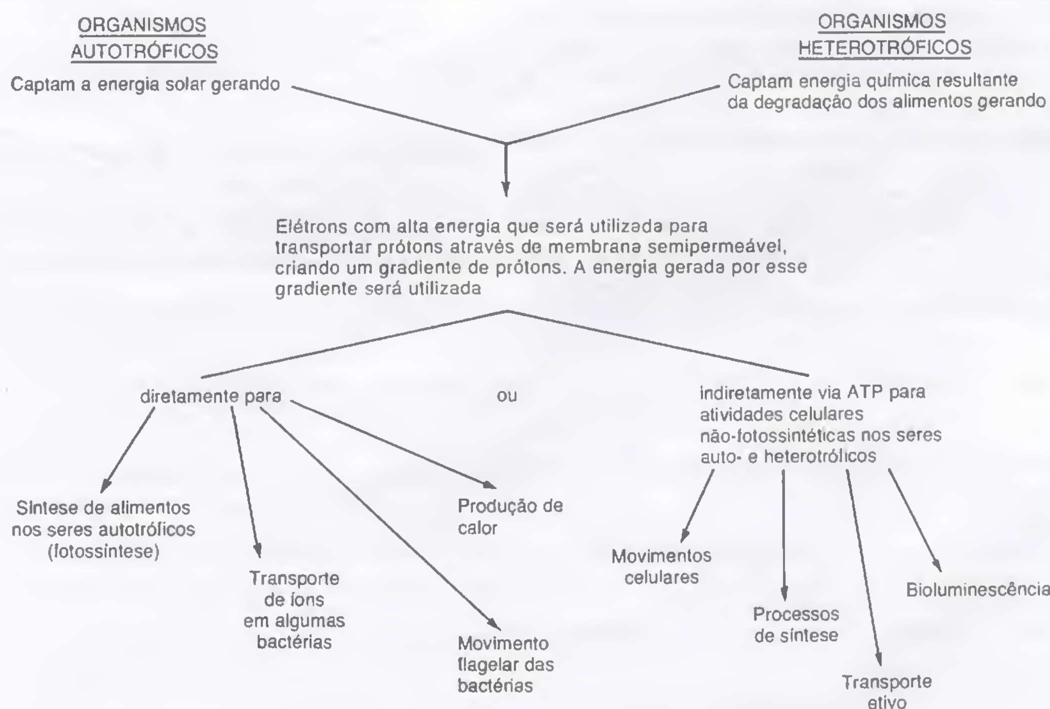


Fig. 4.15 Visão panorâmica dos processos energéticos relacionados com os diversos tipos de células. A energia utilizada tem origem diretamente da luz solar ou indiretamente, através da decomposição dos nutrientes. É interessante observar que, em ambos os casos, gera-se um fluxo de prótons que cria um gradiente. A energia do refluxo destes prótons pode ser utilizada imediatamente ou ser armazenada sob a forma de ATP, composto que contém ligações fosfato muito ricas em energia facilmente mobilizável pela enzima ATPase, abundante nas células.

renal (as células renais e musculares são ricas em mitocôndrias), é resultante da diminuição acentuada, ou mesmo ausência completa, das enzimas da cadeia transportadora de elétrons.

Essas doenças mitocondriais são hereditárias, mas somente por via materna. Homens e mulheres podem apresentar as doenças hereditárias mitocondriais, mas somente as mulheres as transmitem para os descendentes, porque na fertilização a contribuição do espermatozóide, quanto às mitocôndrias, é insignificante. As mitocôndrias do óvulo fecundado (zigoto) e das células dele originadas são praticamente todas derivadas da multiplicação das mitocôndrias do óvulo e, portanto, maternas. As doenças hereditárias mitocondriais apresentam grande variação nos sintomas de um doente para outro, devido à **heteroplasmia**, isto é, as células dos doentes apresentam quantidades variáveis de DNA mitocondrial normal e DNA mitocondrial mutante. O óvulo que leva mitocôndrias maternas mutantes também leva mitocôndrias maternas com o DNA normal.

Sumário

Para a realização de suas atividades, as células usam a energia obtida através da ruptura das ligações covalentes das moléculas dos alimentos. As células das plantas e de raras bactérias são autotróficas, *sintetizando moléculas alimentares complexas a partir de moléculas inorgânicas e da energia solar. As demais células são* heterotróficas. *Estas não são capazes de converter em ligações químicas a energia solar, não sintetizam moléculas alimentares e, portanto, dependem inteiramente do alimento sintetizado pelas células autotróficas para sua sobrevivência.*

Nas células, a energia dos nutrientes é liberada gradativamente e parcialmente transferida para as moléculas de ATP (adenosina-trifosfato), que contêm ligações ricas em energia. Outra parte é dissipada sob a forma de calor, indo aquecer o organismo.

As moléculas energéticas mais usadas pelas células são a glicose e os ácidos graxos. Degradada na matriz citoplasmática, sem participação de oxigênio, pelo processo de glicólise anaeróbia, *cada mol de glicose produz 2 moles de ATP e deixa como resíduo 2 moles de piruvato, que ainda contêm muita energia. Moléculas de piruvato e de ADP passam para a* matriz mitocondrial, *onde também chega oxigênio da respiração, e o processo continua, formando-se acetilcoenzima A, que entra no* ciclo do ácido cítrico *e no* sistema transportador de elétrons *para produzir mais 36 moles de ATP. Do ponto de vista do aproveitamento de energia, a vantagem da mitocôndria é enorme. Sem ela, a célula obteria apenas 2 moles de ATP por mol de glicose. Com a mitocôndria, o rendimento é muito maior.*

As mitocôndrias *são organelas arredondadas ou alongadas localizadas, geralmente, próximo às regiões do citoplasma que necessitam de muita energia. São constituídas por duas membranas. A externa é lisa e muito permeável. A membrana interna contém* cardiolipina, *é seletiva, controla melhor o trânsito molecular nos dois sentidos e se dobra formando pregas para o interior da mitocôndria. Estas dobras aumentam muito a superfície da membrana interna, criando mais área para o sistema transportador de elétrons que aí se localiza. O interior da organela, limitado pela membrana interna, contém a matriz mitocondrial, onde estão as enzimas do ciclo do ácido cítrico.*

A energia liberada na cadeia transportadora de elétrons é utilizada para o transporte de prótons da matriz para o espaço intermembranoso, onde os prótons se acumulam. Esses prótons do espaço intermembranoso fluem de volta para a matriz, através dos corpúsculos elementares, fluxo este cuja energia é convertida, no corpúsculo elementar, em energia química facilmente acessível, graças à síntese do ATP a partir do ADP.

As mitocôndrias possuem DNA e os três tipos de RNA (mensageiro, ribosômico e de transferência), sintetizando algumas proteínas próprias. Mas a maior parte das proteínas que constituem as mitocôndrias é sintetizada no citoplasma, sob o controle do código genético do núcleo celular, sendo, depois, transferidas para a mitocôndria.

Bibliografia

ALBERTS, B. *et al. Molecular Biology of the Cell.* 2nd ed., Garland Press; New York, 1989.

HATEFI, Y. The mitochondrial electron transport oxidative phosphorylation system. *Annu. Rev. Biochem. 54*:1015, 1985.

HINCKLE, P.C. and MCCARTY, R.E. How cells make ATP. *Sci. Am. 283*:104, 1978.

TZAGOLOFF, A. *Mitochondria.* Plenum Press, New York, 1982.

5

Membrana Plasmática. Digestão Intracelular

Roteiro

- *A membrana plasmática mantém constante o meio intracelular, possui receptores para hormônios e outros sinais químicos, e estabelece conexões das células umas com as outras e com a matriz extracelular.*
- *Todas as membranas celulares são constituídas por uma bicamada fluida de fosfolipídios, onde estão inseridas moléculas de proteínas que podem ser deslocadas, no plano da membrana, por atividade do citoesqueleto.*
- *Conforme a maior ou menor facilidade de extração, distinguem-se as proteínas periféricas e as integrais da membrana.*
- *As moléculas de fosfolipídios e de proteínas estão dispostas nas membranas de modo assimétrico: uma face da membrana é diferente da outra.*
- *A superfície externa da membrana plasmática apresenta uma camada rica em glicídeos, o glicocálice.*
- *Os fibronexos, constituídos por diversas moléculas protéicas, estabelecem conexão entre o citoesqueleto e moléculas da matriz extracelular.*
- *Os grupos sangüíneos A-B-O são devidos à estrutura de glicolipídios e glicoproteínas da membrana plasmática.*
- *Os complexos de histocompatibilidade MHC, importantes nos transplantes de órgãos, são glicoproteínas da membrana plasmática.*
- *As moléculas penetram nas células ou delas saem por transporte passivo, transporte ativo ou difusão facilitada.*
- *O transporte em quantidade de material para o interior da célula chama-se endocitose (fagocitose e pinocitose), e o processo inverso é a exocitose.*
- *Os lisosomas são organelas contendo enzimas digestivas com atividade máxima no pH 4,5-5,0 (hidrolases ácidas).*
- *Os microvilos, interdigitações e estereocílios aumentam a superfície celular.*
- *As CAMs são glicoproteínas integrais da membrana que possibilitam a adesão entre as células; algumas CAMs perdem a adesividade quando a concentração de Ca^{2+} é muito baixa.*
- *As membranas plasmáticas formam estruturas de adesão (desmosoma e junção aderente), de vedação do espaço intercelular (zônula oclusiva) e de comunicação entre as células (junção comunicante).*

A **membrana plasmática** ou **celular** separa o meio intracelular do extracelular e é a principal responsável pelo controle da penetração e saída de substâncias da célula.

Por sua diminuta espessura, a membrana plasmática não é visível no microscópio óptico, só podendo ser vista no microscópio eletrônico. Todavia, sua existência já era conhecida antes do microscópio eletrônico graças ao emprego de técnicas indiretas. A observação de que o volume das células se altera de acordo com a concentração das soluções em que elas são colocadas (Fig. 5.1), foi um dos primeiros indícios da existência da membrana celular.

A membrana plasmática participa de numerosas funções celulares. É responsável pela manutenção da constância do **meio intracelular**, que é diferente do **meio extracelular**. Para que as células funcionem, cresçam e se multipliquem, é necessário que as substâncias adequadas sejam selecionadas e transferidas para dentro da célula, e as substâncias desnecessárias sejam impedidas de penetrar ou, então, eliminadas do citoplasma. Graças a seus **receptores** específicos, a membrana tem a capacidade de reconhecer outras células e diversos tipos de moléculas, como, por exemplo, hormônios. Este reconhecimento, pela ligação de uma molécula específica (sinal químico ou ligante) com o receptor da membrana, desencadeia uma resposta que varia conforme a célula e o estímulo recebido. A resposta pode ser contração ou movimento celular, inibição ou estimulação da secreção, síntese de anticorpos, proliferação mitótica etc. Através de suas membranas, certas células se prendem firmemente umas às outras, formando muitas vezes camadas que delimitam compartimentos diferentes. Um exemplo é a camada epitelial que recobre internamente o tubo digestivo e constitui uma barreira com permeabilidade seletiva, situada entre o meio externo (conteúdo do tubo digestivo) e o meio interno. Em diversos tecidos, as membranas de células contíguas podem estabelecer canais de comunicação entre si, por onde têm lugar trocas de moléculas e íons que participam da coordenação das atividades desses agrupamentos celulares.

Além da membrana plasmática, que será estudada neste capítulo, as células eucariontes possuem um elaborado sistema de membranas (exemplos: envoltório nuclear, retículo endoplasmático, mitocôndrias, cloroplastos, aparelho de Golgi) que divide a célula em compartimentos. As mitocôndrias e cloroplastos são subdivididos internamente por membranas, ampliando ainda mais a compartimentação intracelular. Assim, a célula executa, em separado e com mais eficiência, funções especializadas que não poderiam ser realizadas em um único compartimento.

Por outro lado, muitos sistemas enzimáticos encontram-se presos às membranas, o que possibilita uma ordenação seqüencial da atividade de cada enzima, aumentando a eficiência do sistema. As moléculas enzimáticas fixam-se às membranas numa seqüência tal que o produto de uma enzima é processado pela enzima ao lado, e assim sucessivamente, até a obtenção do produto final da cadeia enzimática. Um exemplo é a cadeia trans-

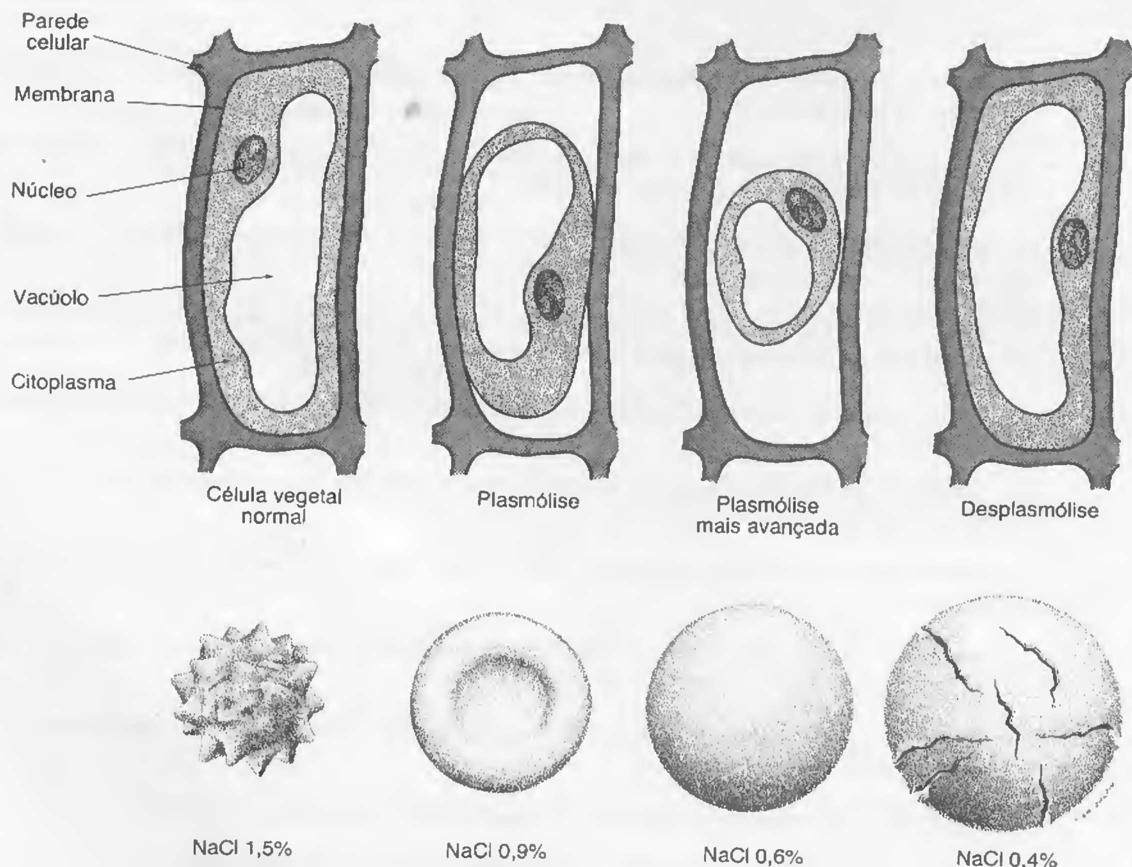


Fig. 5.1 Modificações do volume celular conforme a concentração do meio. **Em cima**, células vegetais em meio isotônico e em meio hipertônico, que provoca uma plasmólise. Voltando ao meio isotônico, a célula readquire sua forma inicial (desplasmólise). **Embaixo**, eritrócitos em meio isotônico (NaCl 0,9%), em meio hipertônico (NaCl 1,5%) e em meio hipotônico (NaCl 0,6 e 0,4%). Em meio fortemente hipotônico, o eritrócito se rompe (hemólise).

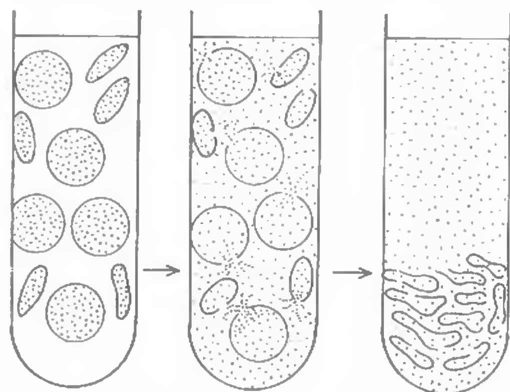


Fig. 5.2 Por serem desprovidos de organelas, os eritrócitos são um material adequado para o isolamento da membrana plasmática. Colocados em meio hipotônico, os eritrócitos se rompem, havendo perda da hemoglobina. Por centrifugação, podem-se obter as membranas isoladas.

portadora de elétrons, cujos componentes (enzimas e transportadores) estão localizados na membrana interna das mitocôndrias e na face interna da membrana celular das bactérias.

Graças ao isolamento de membranas (Fig. 5.2), descobriu-se que a membrana plasmática e as demais membranas celulares são constituídas principalmente de lipídios, proteínas e hidratos de carbono, mas a proporção destes componentes varia muito, conforme o tipo de membrana. Por exemplo, as membranas de mielina que recobrem as fibras nervosas e têm o papel de isolante elétrico, contêm 80% de lipídios, enquanto as membranas mitocondriais internas, metabolicamente muito ativas, contêm apenas 25% de lipídios, apresentando uma predominância das proteínas responsáveis pelo alto metabolismo destas membranas.

Lipídios das membranas

Os lipídios das membranas são moléculas longas com uma extremidade hidrofílica e uma cadeia hidrofóbica. As macromoléculas que apresentam esta característica de possuírem uma região hidrofílica e, portanto, solúvel em meio aquoso, e uma região hidrofóbica, insolúvel em água, porém solúvel em lipídios, são ditas **anfipáticas**. Entre os lipídios freqüentes nas membranas celulares encontram-se **fosfoglicerídeos** (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidiltreonina), **esfingolipídios** e **colesterol**. Os fosfoglicerídeos e os esfingolipídios contêm o radical fosfato e são chamados **fosfolipídios.** Outro constituinte anfipático importante das membranas celulares são os **glicolipídios**, designação genérica para todos os lipídios que contêm hidratos de carbono, com ou sem radicais fosfato. Os glicolipídios mais abundantes nas células dos animais são os **glicoesfingolipídios**, que são componentes de muitos receptores da superfície celular. Os hidratos de carbono dos glicoesfingolipídios são, em geral, moléculas com seis átomos de carbono (hexoses), como a glicose, manose, fucose e galactose. Estes açúcares, associados em diferentes proporções, formam uma enorme variedade de cadeias glicídicas, com diferentes tamanhos, o que permite elevado número de combinações.

As membranas das células animais contêm colesterol, o que não acontece nas células dos vegetais, que possuem outros esteróis. Quanto maior a concentração de esteróis, menos fluida será a membrana. As membranas das células procariontes não contêm esteróis, salvo raras exceções.

A membrana é uma estrutura lipoprotéica fluida

Todas as membranas celulares apresentam a mesma organização básica, sendo constituídas por duas camadas lipídicas fluidas e contínuas, onde estão inseridas moléculas protéicas (Figs. 5.3 e 5.4), constituindo um **mosaico fluido.** Esse modelo explica todos os dados experimentais conhecidos, e é válido para todas as membranas celulares (mitocôndrias, cloroplastos, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, lisosomas, endosomas, grânulos de secreção, peroxisomas, envelope nuclear, membrana plasmática e outras).

As moléculas da camada dupla de lipídios estão organizadas com suas cadeias apolares (hidrofóbicas) voltadas para o interior da membrana, enquanto as cabeças polares (hidrofílicas) ficam voltadas para o meio extracelular ou para o citoplasma, que são meios aquosos. Essas duas camadas lipídicas estão associadas devido à **interação hidrofóbica** de suas cadeias apolares. As proteínas da membrana possuem resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos, e ficam mergulhadas na camada lipídica, de tal modo que:

1) os resíduos hidrofóbicos das proteínas estão no mesmo nível das cadeias hidrofóbicas dos lipídios, e

2) os resíduos hidrofílicos das proteínas ficam na altura das cabeças polares dos lipídios, em contato com o meio extracelular ou com o citoplasma.

Portanto, a membrana é constituída por uma camada hidrofóbica média e por duas camadas hidrofílicas, uma interna (lado citoplasmático) e outra externa (Fig. 5.3).

Diversos experimentos mostraram que as proteínas se deslocam com muita facilidade no plano da membrana. Por exemplo, a fusão de células humanas com células de camundongos — o que pode ser feito com tratamento pelo vírus Sendai — mostra que, após a fusão das células, as proteínas da membrana humana deslocam-se rapidamente, misturando-se com as proteínas da membrana da célula de camundongo. Estas últimas também se deslocam, porém com velocidade mais lenta, pois são proteínas maiores. Outro experimento que demonstra a fluidez da membrana é observado quando se adiciona a lectina concanavalina A a um cultivo de amebas. Essa lectina tem a propriedade de se ligar quimicamente a certas glicoproteínas da membrana e tem sido utilizada para o estudo destas glicoproteínas, que atuam como receptores. Os receptores para a concanavalina A, que normalmente se distribuem por toda a membrana, ao se ligarem à concanavalina migram rapidamente, impulsionados pelo citoesqueleto, para uma determinada região onde ficam concentrados formando um **capuz** (Fig. 5.5). Os deslocamentos descritos nesses dois exemplos mostram que a membrana é um fluido que permite a movimentação das proteínas dentro de uma matriz lipídica líquida.

Proteínas da membrana plasmática

Embora existam diferenças entre os lipídios, que influem nas propriedades das diversas membranas, a atividade metabólica das

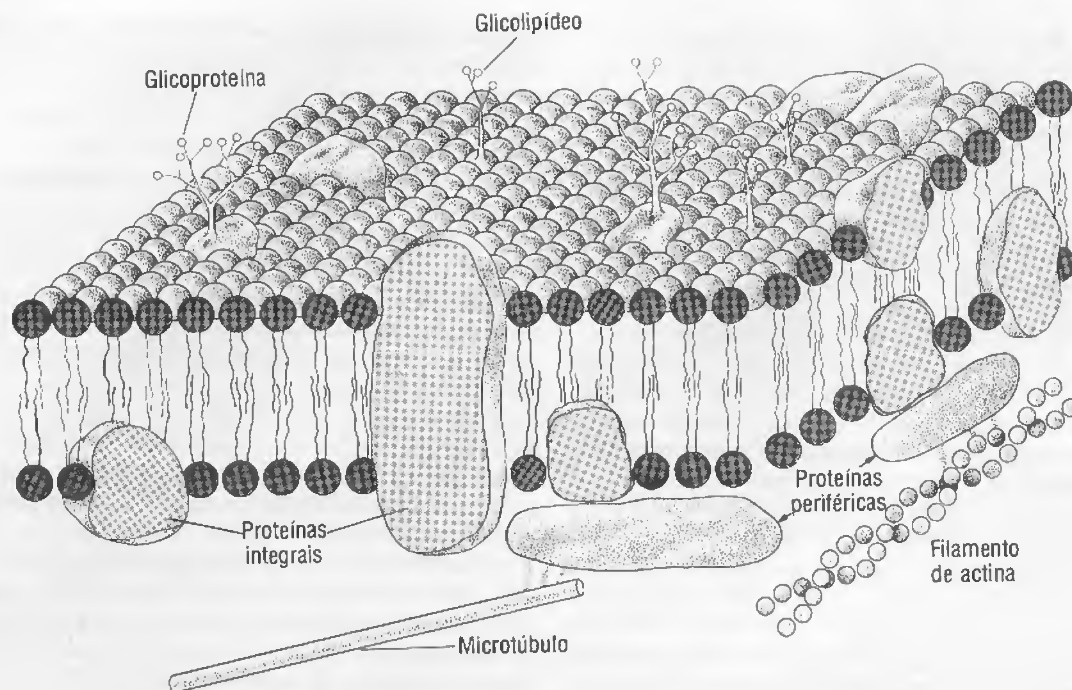


Fig. 5.3 As membranas celulares são constituídas por duas camadas de moléculas lipídicas, com as cadeias apolares (hidrofóbicas) colocadas no interior da membrana e as extremidades polares (hidrofílicas) voltadas para as superfícies da membrana. As moléculas das proteínas integrais estão mergulhadas na camada lipídica, com as porções hidrofóbicas no centro e as porções hidrofílicas nas superfícies da membrana. Algumas destas proteínas atravessam toda a espessura da membrana (**proteínas transmembrana**). As proteínas periféricas não estão mergulhadas na membrana. A inserção dos microtúbulos e filamentos de actina na membrana também está representada neste desenho.

Moléculas de hidratos de carbono associam-se a proteínas da membrana, para formar glicoproteínas, e a lipídios, formando glicolipídios que, na membrana plasmática, aparecem na face externa da membrana como componentes do glicocálice. Observar a acentuada assimetria entre as duas faces da membrana.

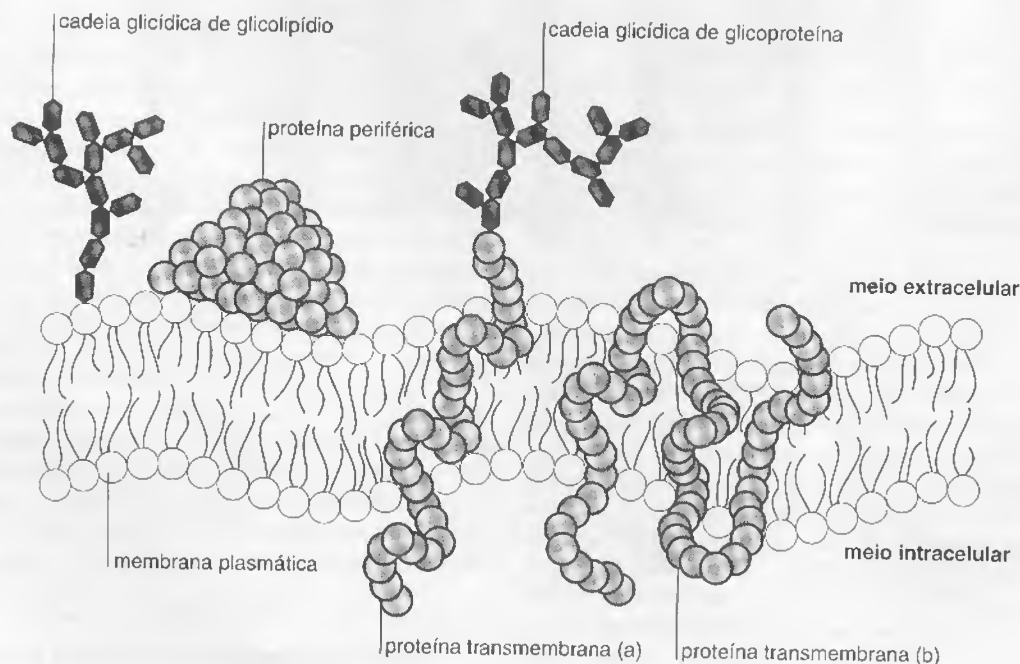


Fig. 5.4 Desenho esquemático mostrando proteínas transmembrana de passagem única (a) e de múltiplas passagens (b). Embora o desenho mostre apenas uma molécula de proteína periférica, localizada na face externa da membrana, a face interna, como mostra a Fig. 5.3, também apresenta proteínas periféricas ou extrínsecas.

membranas depende principalmente das proteínas. Cada tipo de membrana tem suas proteínas características, principais responsáveis pelas funções da membrana.

A membrana plasmática possui grande variedade de proteínas, que podem ser divididas em dois grandes grupos, as **integrais** ou **intrínsecas** e as **periféricas** ou **extrínsecas**, dependendo da facilidade de extraí-las da bicamada lipídica.

As proteínas integrais estão firmemente associadas aos lipídios e só podem ser separadas da fração lipídica através de técnicas drásticas, como o emprego de detergentes. Setenta por cento das proteínas da membrana plasmática são integrais, e aqui se incluem a maioria das enzimas da membrana, as glicoproteínas responsáveis pelos grupos sangüíneos M-N, proteínas transportadoras, receptores para hormônios, drogas e lectinas. As lectinas são moléculas com ao menos dois sítios ativos que se ligam a hidratos de carbono específicos e podem causar aglutinação de células. Foram descobertas nas plantas, mas hoje se sabe que existem na maioria dos seres vivos. Elas são muito usadas em biologia celular para analisar a composição química dos hidratos de carbono das glicoproteínas e glicolipídios presentes na face externa da membrana plasmática.

As moléculas das proteínas integrais, graças às zonas hidrofóbicas situadas na sua superfície, prendem-se aos lipídios da membrana por interação hidrofóbica, deixando expostas ao meio aquoso apenas suas partes hidrofílicas (Figs. 5.3 e 5.4). Algumas destas moléculas protéicas atravessam inteiramente a bicamada lipídica, fazendo saliência em ambas as superfícies da membrana, sendo denominadas **proteínas transmembrana**. As proteínas transmembrana podem atravessar a membrana uma única vez, ou então apresentar a molécula muito longa e dobrada, atravessando a membrana várias vezes, recebendo então o nome de **proteínas transmembrana de passagem múltipla**.

As proteínas extrínsecas podem ser isoladas facilmente pelo emprego de soluções salinas. Através deste procedimento, as proteínas extrínsecas são obtidas puras, livres de lipídios. Essas proteínas não interagem com a região hidrofóbica da bicamada lipídica. Elas se ligam à membrana por interação com as proteínas integrais, ou interagindo com a região polar dos lipídios.

Os conhecimentos sobre as proteínas da membrana plasmática foram muito facilitados pelo estudo da membrana dos eritrócitos de mamíferos, porque estes corpúsculos não possuem um sistema interno de membranas. Neles, a única membrana existente é a membrana plasmática, que pode ser isolada junto com o citoesqueleto subjacente. A separação das proteínas da membrana dos eritrócitos e do seu citoesqueleto, por meio de eletroforese em gel, levou à descoberta de três proteínas principais, que foram estudadas minuciosamente. Várias outras proteínas foram identificadas, mas os conhecimentos sobre elas não são tão completos. As três proteínas principais mencionadas serão estudadas sumariamente a seguir, como exemplos.

Uma destas proteínas é a **espectrina**. Trata-se de uma proteína extrínseca, fibrosa (molécula muito alongada), formada por dois polipeptídeos, um com 220.000 e o outro com 240.000 dáltons, aproximadamente. As moléculas de espectrina formam uma malha na superfície interna da membrana do eritrócito. Trata-se de uma proteína do citoesqueleto, provavelmente a principal responsável pela forma de disco bicôncavo do eritrócito.

A proteína chamada **banda 3** (o nome vem da sua posição no gel) é uma proteína transmembrana que atravessa a bicamada lipídica diversas vezes. A molécula da banda 3 tem, portanto, uma forma pregueada. Ela possui alguns hidratos de carbono presos à parte da molécula localizada na face externa do eritrócito, o que

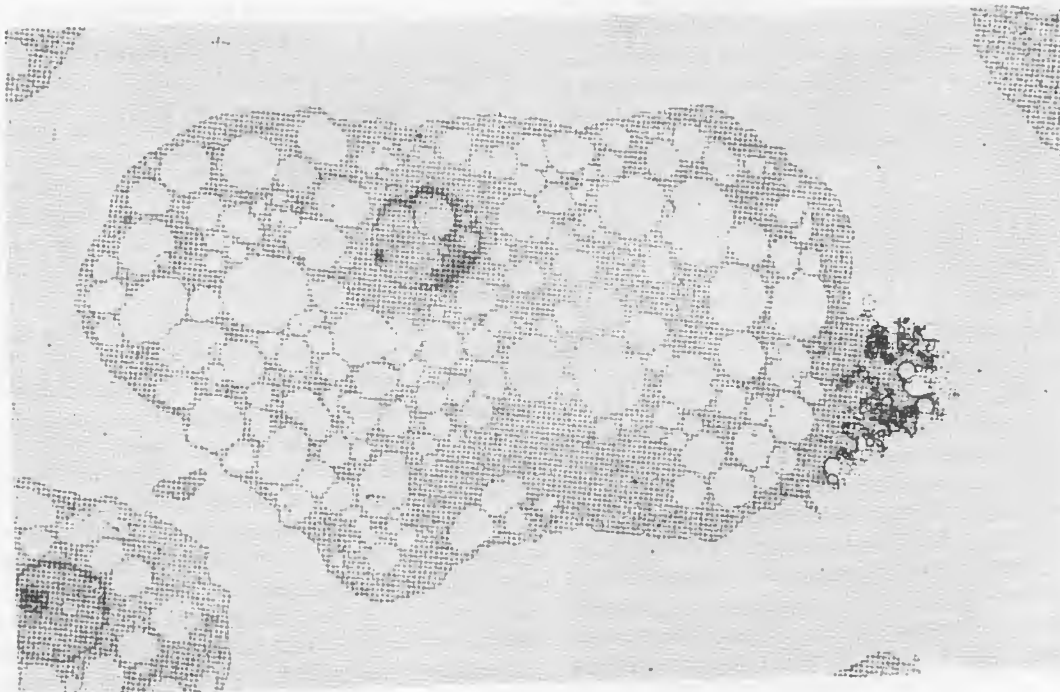


Fig. 5.5 Acúmulo dos receptores de concanavalina A em um dos pólos da *Entamoeba histolytica*. Normalmente, os receptores se distribuem por toda a membrana, mas o tratamento pela concanavalina A promove a migração dos receptores para uma posição polar (*cap formation*). O material foi fixado em glutaraldeído e tratado com benzidina, para revelar a peroxidase usada para marcar a concanavalina A. Aumento: 3.500 ×. (Cortesia de A. Martinez-Palomo.)

é uma característica geral das glicoproteínas da membrana. A banda 3 serve como caminho para a passagem de ânions através da membrana. Quando passam pelos capilares pulmonares, os eritrócitos trocam HCO^- por Cl^- durante o processo de liberação de CO_2. A banda 3 é o canal por onde sai o HCO^- e entra o Cl^- nos eritrócitos.

A última das três principais proteínas da membrana dos eritrócitos é a glicoproteína denominada **glicoforina**, uma proteína intrínseca que, como a banda 3, também é transmembrana. Ela atravessa a membrana apenas uma vez, e a maior parte de sua molécula faz saliência na superfície externa do eritrócito. Aí a glicoforina exibe 16 cadeias glicídicas, com 100 moléculas de hidratos de carbono. Existe, na molécula da glicoforina, um curto segmento hidrofóbico que fica no interior da membrana e dois segmentos hidrofílicos, um localizado no lado citoplasmático e o outro na superfície externa da membrana.

Glicoproteínas e glicolipídios são marcadores responsáveis pelos grupos sangüíneos

Um bom exemplo de marcadores da superfície celular são as glicoproteínas e glicolipídios que determinam os grupos sangüíneos. Os grupos M-N são devidos tanto à parte protéica como à parte glicídica da glicoforina, uma glicoproteína da membrana dos eritrócitos.

Os grupos A-B-O estão na dependência de pequenas variações na estrutura dos hidratos de carbono presentes nos glicolipídios e glicoproteínas da membrana dos eritrócitos. As pessoas com sangue do tipo A apresentam a hexose modificada N-acetilgalactosamina numa determinada posição das moléculas de hidratos de carbono da superfície. As pessoas com o sangue do tipo B possuem, na mesma posição, a molécula de galactose. Já o tipo AB é caracterizado pela presença de moléculas de hidratos de carbono com galactose ou com N-acetilgalactosamina na mesma posição. No sangue do tipo O, a mesma posição se apresenta desocupada, não apresentando nenhum dos açúcares mencionados.

A membrana plasmática é assimétrica

Existe forte assimetria entre as duas faces da membrana plasmática, tanto na composição de lipídios como nas proteínas. Por exemplo, na membrana dos eritrócitos a camada lipídica externa é mais rica em fosfatidilcolina, enquanto, na camada lipídica em contato com o citoplasma, predominam fosfatidiletanolamina (lecitina) e fosfatidilserina. Como a molécula de fosfatidilserina tem carga negativa, existe, além da diferença química entre as duas lâminas da bicamada lipídica, também uma diferença de carga elétrica. Outra diferença consiste na distribuição das moléculas de glicolipídios e glicoproteínas que se orientam com as extremidades contendo açúcares fazendo saliência na superfície da célula (Figs. 5.3 e 5.4) e nunca na face citoplasmática da membrana.

As Figs. 5.3 e 5.4 ilustram a assimetria na distribuição das proteínas. As proteínas periféricas estão concentradas na face citoplasmática da membrana, onde algumas podem ligar-se a filamentos do citoesqueleto. Na face externa aparecem as extremidades de proteínas integrais, incluindo os resíduos glicídicos das glicoproteínas, que vão se adicionar aos glicídios complexos dos glicolipídios e a outras moléculas para constituírem uma camada de açúcares, na face externa da membrana, denominada **glicocálice**.

Visualização das proteínas integrais das membranas

Isto é possível pela técnica de **criofratura**, que consiste no congelamento rápido do tecido, seguido de sua fratura. As superfícies de fratura são dessecadas e sombreadas com uma camada de metal pesado depositada em ângulo agudo e, depois, com uma camada de carbono que servirá de suporte. Em seguida, os componentes celulares são dissolvidos, restando uma réplica da superfície de fratura. Esta réplica será então estudada no microscópio eletrônico.

Com essa técnica, a membrana sofre fratura na região que fica entre as duas camadas lipídicas, porque os lipídios estão presos por interações hidrofóbicas, um tipo de ligação fraca. Formam-se, assim, artificialmente, duas lâminas que expõem as faces situadas no interior da membrana. A lâmina interna, em contato com o citoplasma, expõe a denominada **face P** (protoplasmática), e a externa expõe a chamada **face E** (externa). A face P olha para fora da célula e a face E olha em sentido oposto (Fig. 5.6). A técnica de criofratura mostra muito bem as proteínas integrais da membrana, que aparecem como partículas presas principalmente à face P, enquanto a face E mostra as cavidades onde estas partículas estavam encaixadas.

As unidades de membrana têm diferentes funções

No microscópio eletrônico, a membrana plasmática e as demais membranas celulares aparecem como duas camadas escuras, separadas por uma camada clara central. Admite-se que este aspecto trilaminar decorre da redução do tetróxido de ósmio usado como fixador e de sua deposição nas extremidades polares dos lipídios. A parte central clara corresponderia às longas cadeias lipídicas apolares (Fig. 5.7).

A mesma estrutura trilaminar da membrana plasmática é vista em todas as membranas da célula. Por isso, a estrutura trilaminar foi denominada **unidade de membrana** ou **membrana unitária**. A lâmina central, clara, mede cerca de 3,5 nm, e as lâminas escuras medem aproximadamente 2,0 nm cada uma. A espessura total das membranas unitárias varia de 7 a 10 nm.

Apesar de morfologicamente parecidas, as unidades de membrana não são iguais, nem na morfologia, nem nas funções. Com o aperfeiçoamento das técnicas de preparação dos tecidos para estudo no microscópio eletrônico, observou-se que as unidades de membrana de uma mesma célula apresentam diferenças na espessura de suas lâminas. Por outro lado, membranas isoladas mostram propriedades enzimáticas muito diferentes, bem como diversidades em sua composição lipídica. Portanto, embora a organização molecular básica das membranas seja a mesma, elas variam muito na composição química e nas propriedades biológicas.

Uma mesma membrana, como a membrana plasmática, pode mostrar áreas diferenciadas. Por exemplo, a membrana dos

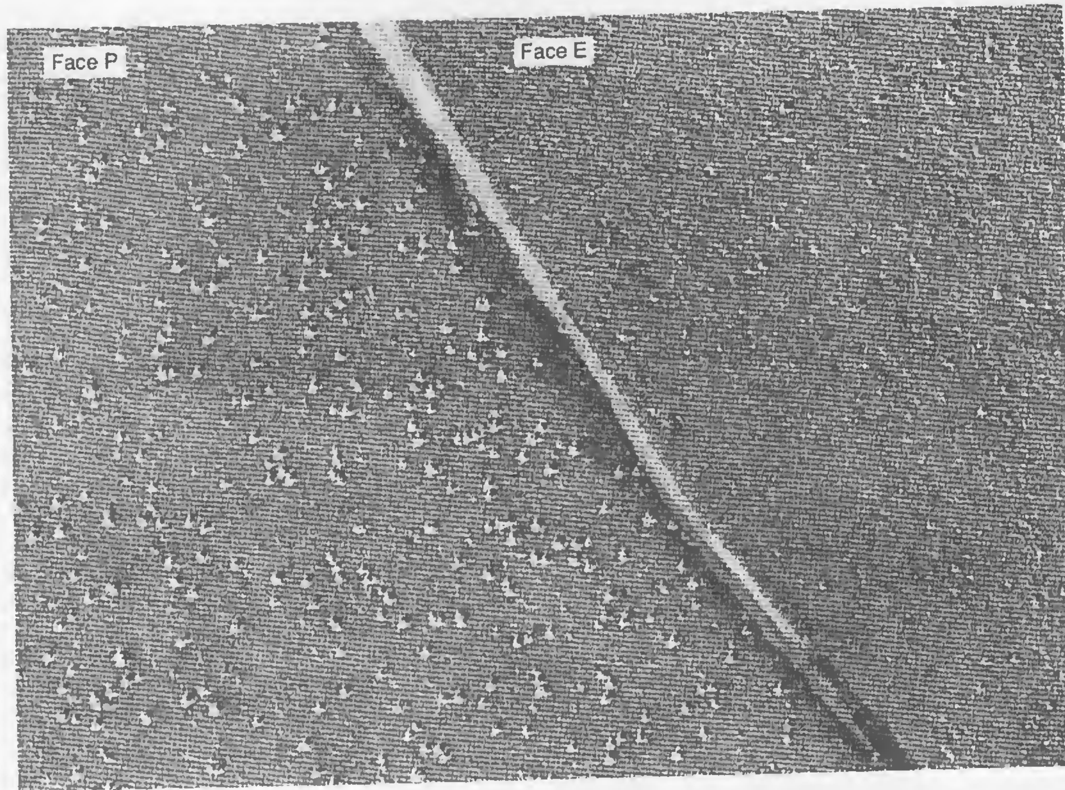


Fig. 5.6 Microscopia eletrônica de réplica da membrana plasmática criofraturada. A fratura tem lugar entre a lâmina interna e a externa da membrana. A maioria das moléculas protéicas permanece aderente à superfície da lâmina interna que olha para fora da célula (face P). Por isso, a face P das membranas plasmáticas mostra numerosas partículas globulares. A superfície interna da lâmina externa, conhecida como face E, apresenta poucas micelas protéicas. Aumento: 150.000 ×. (Cortesia de A. Martinez-Palomo.)

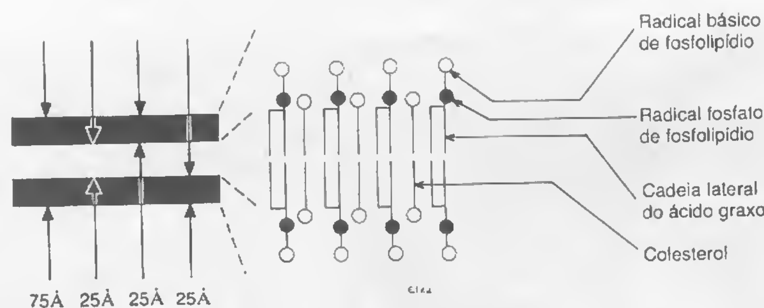


Fig. 5.7 À esquerda, aspecto da membrana vista ao microscópio eletrônico (duas lâminas escuras e uma lâmina central, clara). **À direita**, disposição dos lipídios.

microvilos das células do epitélio do revestimento intestinal contém dipeptidases e dissacaridases, enzimas responsáveis pelas fases finais da digestão das proteínas e glicídeos, respectivamente, e que não existem no resto da membrana plasmática dessas células.

As células são recobertas por glicídeos

As células apresentam, na superfície externa da membrana plasmática, uma camada de hidratos de carbono ligados a proteínas ou a lipídios, denominada **glicocálice** (Figs. 5.8 e 5.9).

O glicocálice é constituído: 1) pelas porções glicídicas das moléculas de glicolipídios da membrana plasmática, que fazem saliência na superfície da membrana; 2) por glicoproteínas integrais da membrana ou adsorvidas após secreção; e 3) por proteoglicanas, todas secretadas e, em seguida, adsorvidas pela superfície celular. Certos glicolipídios possuem em suas moléculas uma parte glicídica muito complexa, contendo resíduos de D-glicose, de D-galactose, de N-acetil-D-galactosamina e de ácido N-acetil-neuramínico (ácido siálico).

As proteoglicanas são formadas pela associação de moléculas protéicas e hidratos de carbono denominados glicosaminoglicanas (antigamente chamadas mucopolissacarídeos). As glicosaminoglicanas são polímeros lineares de dissacarídeos, onde

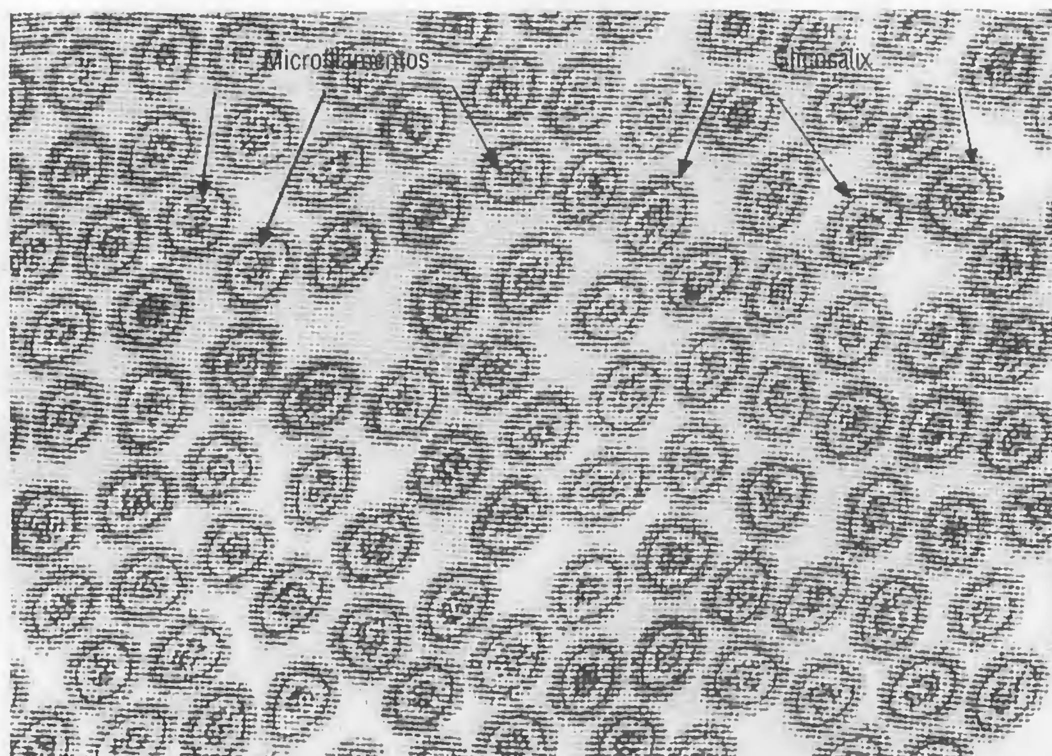


Fig. 5.8 Glicocálice nos prolongamentos (microvilos) das células intestinais. Os microvilos, com microfilamentos no interior, aparecem em corte transversal. Observar a membrana plasmática, da qual nasce o glicocálice. Eletromicrografia. Aumento: 100.000 ×.

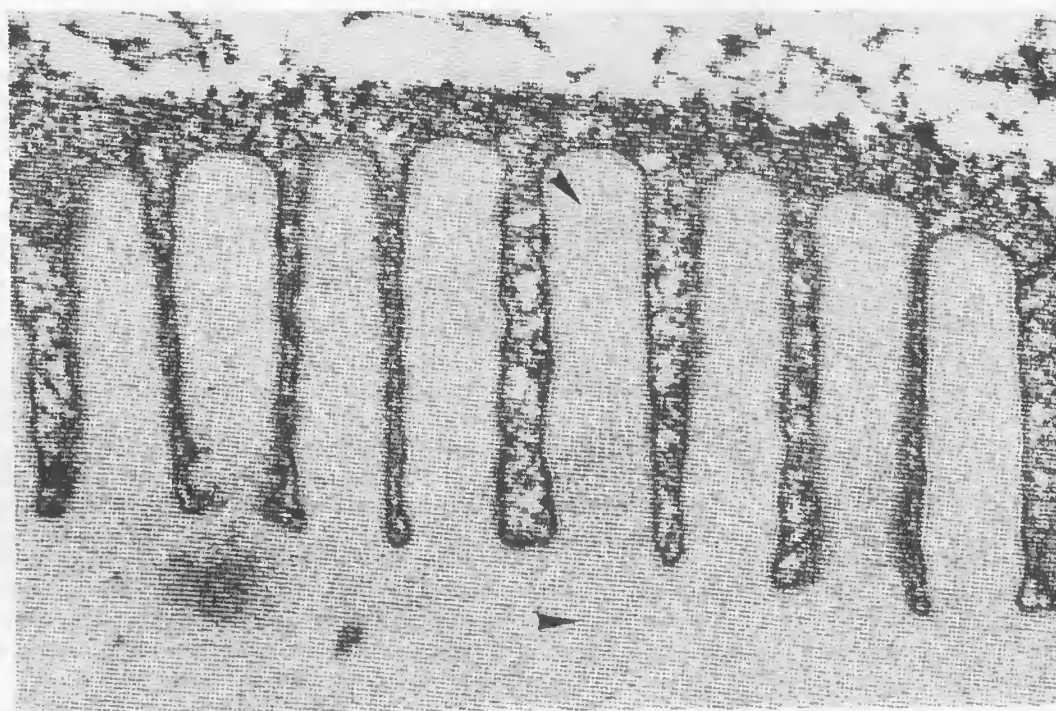


Fig. 5.9 Glicocálice das células epiteliais do intestino de rato, demonstrado pelo vermelho de rutênio. Observar também os microfilamentos que penetram nos microvilos (cabeças de setas). Microscopia eletrônica. Aumento: 84.000 ×. (Cortesia de A. Martinez-Palomo.)

ocorre repetitivamente a glicosamina. A maioria das glicosaminoglicanas é sulfatada, e todas são muito hidrófilas.

Dentre as glicoproteínas secretadas e que passam a fazer parte do glicocálice, uma das mais abundantes é a **fibronectina**. Trata-se de uma molécula em forma da letra V, constituída por dois polipeptídeos semelhantes, cada um pesando 250.000 dáltons. A molécula de fibronectina possui várias regiões ativas, capazes de se combinarem com moléculas do meio extracelular e da superfície de outras células. Tem a função de unir as células umas às outras e à matriz extracelular (v. Cap. 12). A fibronectina estabelece uma continuidade entre o citoesqueleto e as macromoléculas do material extracelular dos tecidos (matriz extracelular). Os microfilamentos de actina do citoesqueleto ligam-se a moléculas da proteína **vinculina** que, por sua vez, prendem-se a uma proteína intrínseca da membrana, com peso molecular de 140.000 dáltons, e esta proteína se liga à fibronectina do glicocálice. Por outras regiões ativas de sua molécula, a fibronectina liga-se a proteínas da matriz extracelular, dentre as quais se destaca o colágeno. O conjunto de macromoléculas protéicas constituído pela actina, vinculina, proteína intrínseca de 140.000 dáltons e fibronectina, denominado **fibronexus**, é o elo de união funcional, dinâmico, entre o citoesqueleto de uma célula e a superfície de outras células ou a matriz extracelular dos tecidos.

Mas a fibronectina não é a única proteína que estabelece conexão entre as células e a matriz extracelular. As células dos tecidos epiteliais de revestimento, por exemplo, ligam-se ao colágeno por intermédio da glicoproteína **laminina**, que é secretada pelas células epiteliais e passa a fazer parte do seu glicocálice.

O glicocálice é funcionalmente importante e sua composição não é estática. Varia de um tipo celular para outro. Numa mesma célula, varia de acordo com a região da membrana e conforme a atividade funcional da célula em determinado momento.

As células se reconhecem

Numerosas evidências demonstram que a superfície celular é dotada de certo grau de especificidade que permite às células se reconhecerem mutuamente e estabelecerem certos tipos de relacionamento.

Cultivando-se células hepáticas e renais, dissociadas e misturadas, em meio líquido e mantido sob leve agitação, após certo tempo observar-se-á o aparecimento de dois aglomerados celulares. Um deles só contém células hepáticas, enquanto o outro contém apenas células renais. No começo, as células estavam individualmente isoladas e misturadas; entretanto, como o cultivo foi mantido em agitação leve, as células se chocaram ao acaso e as do mesmo tipo aceitaram-se mutuamente, aderindo umas às outras e formando um esboço de tecido.

Outro exemplo que mostra esse papel biológico da superfície da membrana é o fenômeno conhecido como **inibição por contato**. Quando as células são cultivadas presas a um suporte — como uma lamínula, por exemplo —, elas proliferam, formando uma lâmina de uma única camada de células. Esta experiência foi feita com diversos tipos celulares, inclusive fibroblastos. Iniciando-se o cultivo com vários grupos de fibroblastos, colocados em locais separados de uma mesma lamínula, as células de cada grupo multiplicar-se-ão sobre a lamínula, formando uma camada celular. Cada grupo de células cresce separadamente, mas, quando as células de um grupo se encontram com as células de outro grupo, as mitoses cessam. Portanto, o contato de células do mesmo tipo, nesta experiência, inibe a multiplicação celular. É interessante notar que o mesmo experimento feito com células cancerosas mostra que estas **perdem a propriedade de inibição por contato**. Depois de se encontrarem, as células cancerosas continuam se dividindo e amontoam-se desordenadamente umas sobre as outras.

Como acontece com as macromoléculas em geral, as proteínas da membrana são imunogênicas, isto é, promovem uma resposta imunitária quando penetram num organismo estranho. Por exemplo, o transplante de tecidos de um animal para outro estimula o animal receptor a produzir células e anticorpos que atacam as proteínas da membrana plasmática das células transplantadas. Em humanos e em outros mamíferos, o mecanismo para distinguir o que é próprio do organismo (*self*) daquilo que é estranho (*non-self*) está na dependência de um grupo de moléculas glicoprotéicas da membrana, que fazem saliência na superfície externa e são chamadas de **complexo principal de histocompatibilidade** ou **MHC** (*major histocompatibility complex*). Há duas classes de MHC, denominadas MHCI e MHCII. Todas as células do organismo, exceto as do sistema imunitário, contêm na superfície MHCI. As células do sistema imunitário, responsáveis pela resposta imune, apresentam o complexo MHCII em suas superfícies (principalmente os leucócitos). Os dois MHC são glicoproteínas cujas moléculas têm uma parte constante e uma parte variável. A parte variável difere muito, na seqüência de aminoácidos, de pessoa para pessoa, de tal maneira que não existe a possibilidade de mais de uma pessoa apresentar MHC idênticos. A única exceção são os gêmeos univitelinos ou gêmeos idênticos, por serem provenientes do mesmo óvulo e do mesmo espermatozóide. Portanto, suas células são geneticamente iguais, e, nesses gêmeos, as proteínas celulares são idênticas. Para minimizar a resposta imunitária, causa da rejeição dos transplantes, procuram-se doadores cujos complexos MHC sejam o mais semelhante possível aos do receptor.

Transporte através da membrana

Para a maioria das substâncias, existe uma relação direta entre sua solubilidade nos lipídios e sua capacidade de penetração nas células. De modo geral, os compostos hidrofóbicos, solúveis nos lipídios, como os ácidos graxos, hormônios esteróides e anestésicos, atravessam facilmente a membrana. Já as substâncias hidrófilas, insolúveis nos lipídios, penetram nas células com mais dificuldade, dependendo do tamanho da molécula e, também, de suas características químicas. A configuração molecular poderá permitir que a substância seja transportada por intermédio de um dos mecanismos especiais desenvolvidos durante a evolução, como o **transporte ativo** e a **difusão facilitada.**

Permeabilidade à água

A membrana celular é muito permeável à água. Colocadas em uma **solução hipotônica**, as células aumentam de volume devido à penetração de água (Fig. 5.1). Se o aumento de volume for muito acentuado, a membrana plasmática se rompe e o conteúdo da célula extravasa, fenômeno conhecido como **lise celular**. Inversamente, quando colocadas em **solução hipertônica**, as células diminuem de volume devido à saída de água (Fig. 5.1). Havendo entrada ou saída de água, a forma da célula também se altera, por ser ela em parte determinada pelo estado de hidrata-

ção dos colóides celulares. Nas **soluções isotônicas**, o volume e a forma da célula não se alteram.

Nas células das plantas ocorre fenômeno semelhante ao observado nas dos animais, mas as conseqüências são diferentes, devido à parede de celulose. Em solução hipertônica, as células das plantas perdem água e diminuem de volume, separando-se o citoplasma da parede celular, que é rígida. Este fenômeno é chamado **plasmólise**. Quando colocada em meio hipotônico, a célula vegetal aumenta de volume, como o eritrócito, mas não se rompe devido à parede de celulose. Esta parede limita o aumento de volume da célula e o mantém dentro de uma faixa que não excede a resistência da membrana plasmática. O aumento de volume sofrido por uma célula vegetal, ao passar de uma solução hipertônica para uma solução hipotônica, chama-se **desplasmólise** (Fig. 5.1).

Como foi visto anteriormente, existe uma relação direta entre a solubilidade das substâncias em lipídios e a facilidade com que elas penetram nas células. Entretanto, a membrana também é muito permeável à água e a certas substâncias hidrófilas e insolúveis em lipídios, como a uréia e o glicerol, graças a moléculas protéicas localizadas na espessura da membrana, atravessando-a de uma face a outra. Estas proteínas transmembrana formam "poros funcionais", isto é, caminhos hidrófilos pelos quais passam muitos íons e moléculas que não conseguem atravessar a barreira lipídica.

Difusão passiva

Muitas moléculas penetram nas células ou delas saem por **difusão passiva**, isto é, como a distribuição do soluto tende a ser uniforme em todos os pontos do solvente, o soluto penetra na célula quando sua concentração é menor no interior celular do que no meio externo, e sai da célula no caso contrário. A força que impulsiona o soluto para dentro ou para fora da célula é a agitação térmica das moléculas do soluto. A difusão passiva não gasta energia. Trata-se de um processo físico de difusão a favor de um gradiente.

Transporte ativo

Outro processo de passagem através da membrana celular é o **transporte ativo**. Neste caso há consumo de energia, e a substância pode ser transportada de um local de baixa concentração para um outro de alta concentração. Portanto, o soluto na difusão ativa é **transportado contra um gradiente**, que pode ser um gradiente apenas químico, no caso de solutos não-eletrólitos, ou então um gradiente elétrico e químico, quando o soluto é ionizado. Assim, por exemplo, quando a célula transporta íons sódio (Na^+) do citoplasma (onde sua concentração é baixa) para o meio extracelular (onde sua concentração é mais alta), deve ser vencido um obstáculo químico, representado pela concentração elevada de íons sódio no meio extracelular, e um obstáculo elétrico, correspondente à soma das cargas positivas dos íons sódio, que dificulta a entrada de novos íons positivos no espaço extracelular.

Estudos realizados com membranas de eritrócitos, células nervosas e outras mostraram que a energia gasta no transporte ativo provém do ATP, que é hidrolisado em ADP. O transporte ativo é bloqueado pelos inibidores da respiração, como o dinitrofenol, cianetos, azida e iodoacetato, inibidores da síntese de ATP.

Difusão facilitada

Numerosas substâncias, como a glicose e alguns aminoácidos, penetram nas células por **difusão facilitada**, sem gasto de energia. Nesse caso, a difusão se processa a favor de um gradiente, porém em velocidade maior do que na difusão passiva.

A velocidade com que se processa a difusão facilitada é estéreo-específica. Em conseqüência, os compostos isômeros geralmente penetram com velocidades muito diferentes. Nos eritrócitos existe difusão facilitada de D-glicose e D-galactose, mas o mesmo não ocorre em relação às formas L destes dois açúcares.

A velocidade da difusão facilitada não é proporcional à concentração do soluto, exceto em concentrações muito baixas. Elevando-se gradativamente a concentração da molécula penetrante, chega-se a um ponto de saturação além do qual a velocidade de penetração não aumenta mais. Esta e outras propriedades sugerem fortemente que, na penetração facilitada, a substância penetrante se combina com uma **molécula transportadora** ou **permease**, localizada na membrana plasmática (Fig. 5.10). Quando todas as moléculas transportadoras estão ocupadas, a velocidade de penetração não pode aumentar.

A difusão facilitada mostra algumas semelhanças com os processos enzimáticos. Por exemplo, ela é muito afetada pela temperatura. Aparentemente, a combinação e a separação da substância penetrante com a molécula transportadora equivalem à combinação e separação entre uma enzima e seu substrato.

Transporte impulsionado por gradientes iônicos

A célula pode utilizar a energia potencial de gradientes de íons, geralmente Na^+, mas também K^+ e H^+, para transportar moléculas e íons através da membrana. O epitélio de revestimento do intestino delgado é um exemplo elucidativo, para a compreensão desse tipo de transporte contra gradiente. A ingestão de alimentos leva glicose para a luz do intestino delgado, de onde ela

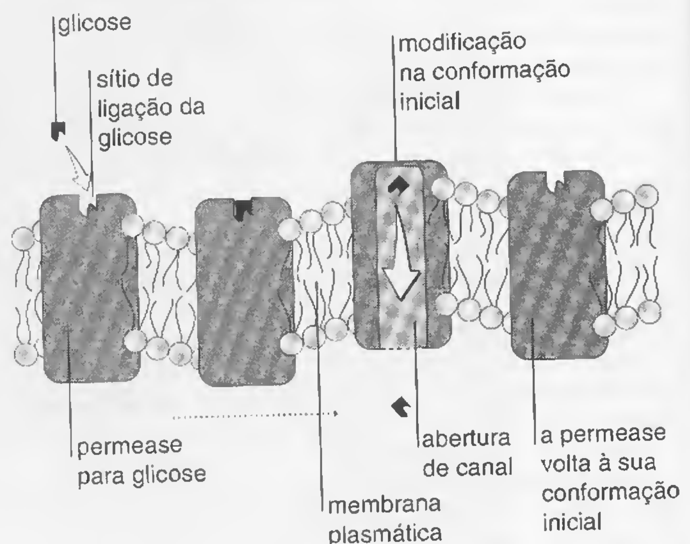


Fig. 5.10 Esquema da permease da glicose. Esse açúcar tem sua penetração facilitada por uma proteína integral da membrana que modifica sua forma ao captar glicose do meio extracelular. Admite-se que a modificação conformacional da permease facilita o transporte de glicose sem gasto de energia.

deve ser absorvida pelas células do epitélio e transferida para a corrente sangüínea. O transporte de glicose pela membrana plasmática da porção apical das células epiteliais do revestimento intestinal se faz contra o gradiente de glicose existente no citoplasma dessas células epiteliais. Foi observado que essa penetração de glicose se faz concomitantemente com a penetração de Na^+. Trata-se de um **co-transporte**, realizado com gasto de energia fornecida pelo gradiente de Na^+. A concentração de Na^+ no citoplasma das células é muito baixa, pela atividade das moléculas protéicas que, por transporte ativo, bombeiam Na^+ para fora das células (bombas de Na^+). Como a concentração de Na^+ é alta na luz do intestino, esses íons tendem a penetrar constantemente nas células epiteliais do revestimento intestinal. A energia do movimento dos íons Na^+ é "aproveitada" pelas células epiteliais, para realizar o co-transporte de glicose para dentro da célula contra um gradiente de glicose. Portanto, os íons Na^+ penetram nas células epiteliais a favor de um gradiente, fornecendo energia para impulsionar as moléculas de glicose contra um gradiente. Esse tipo de co-transporte, que movimenta íons e moléculas na mesma direção, no exemplo para dentro da célula, chama-se **simporte**.

Nesses casos de co-transporte, a proteína transportadora que possibilita o simporte capta tanto glicose como Na^+ no meio extracelular (luz do intestino). A liberação do Na^+ no citoplasma, onde a concentração de Na^+ é baixa, causa uma modificação na forma da molécula transportadora, que perde sua afinidade para a glicose. Desse modo, a molécula de glicose captada na luz intestinal é liberada dentro da célula epitelial do intestino. Em seguida, a glicose difunde-se no citoplasma e, pela parte basal das células epiteliais, passa, por difusão facilitada, para o tecido adjacente, onde penetra nos capilares sangüíneos para ser distribuída pelo organismo.

Em outros casos de co-transporte, foi observado que o íon que fornece energia e a molécula que é transportada movem-se em direções opostas, constituindo o que se denomina **antiporte** (Fig. 5.11). Nos antiportes, quando o íon fornecedor de energia se movimenta para o citoplasma, a molécula transportada é transferida para fora da célula, e vice-versa.

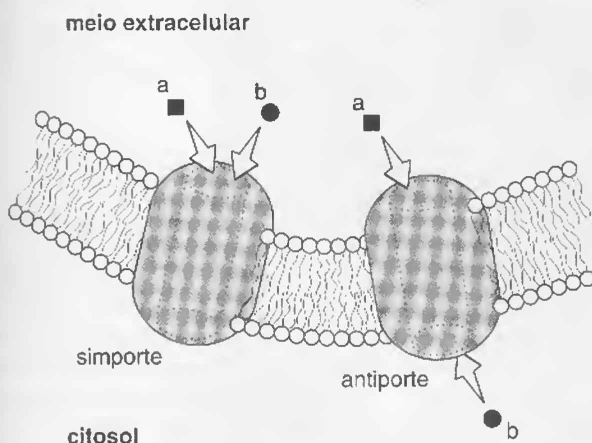


Fig. 5.11 Nesse desenho, os íons representados pelo quadrado (a), mais concentrados do meio extracelular, impulsionam a molécula (b) para dentro da célula, no **simporte**. Quando a molécula é transportada em sentido oposto ao movimento dos íons, o sistema se denomina **antiporte**. A energia derivada do gradiente iônico de (a) é utilizada para movimentar a molécula ou íon (b).

Muitas moléculas importantes para as células, como hidratos de carbono e aminoácidos, bem como íons, podem ser transportadas por meio de simportes e antiportes, além dos outros processos de transporte já mencionados.

Transporte em quantidade

Pelos processos de difusão passiva, difusão facilitada e difusão ativa, moléculas pequenas e íons atravessam a membrana plasmática e penetram no citoplasma ou dele saem.

Entretanto, as células também são capazes de transferir para o seu interior, em bloco, grande quantidade de macromoléculas (proteínas, polissacarídeos, polinucleotídeos) e, até mesmo, partículas visíveis ao microscópio óptico, como bactérias e outros microrganismos. O transporte em bloco é sempre acompanhado por alterações morfológicas da superfície celular, onde se formam estruturas que englobam o material a ser introduzido na célula. O transporte em quantidade para dentro da célula, também chamado **endocitose**, é feito por dois processos denominados **fagocitose** e **pinocitose**, que, apesar de algumas diferenças superficiais, têm muito em comum nos seus princípios básicos. Quando a transferência de macromoléculas tem lugar em sentido inverso, isto é, do citoplasma para o meio extracelular, o processo recebe o nome genérico de **exocitose**. Por exemplo, as células secretoras de proteínas, como as do pâncreas exócrino, acumulam o produto de secreção em grânulos citoplasmáticos revestidos de membrana, que se fundem com a membrana celular e se abrem para o exterior da célula, eliminando assim, por exocitose, as macromoléculas secretadas.

Fagocitose

É o nome dado ao processo pelo qual a célula, graças à formação de pseudópodos, engloba no seu citoplasma partículas sólidas que, por suas dimensões, são visíveis ao microscópio óptico. Portanto, a fagocitose pode ser facilmente observada pelo estudo de células vivas com o microscópio de contraste de fase. A fagocitose tem lugar quando a partícula se fixa a receptores específicos da membrana celular, capazes de desencadear uma resposta da qual participa o citoesqueleto (Figs. 5.12 e 5.13).

Nos protozoários, a fagocitose participa do processo de alimentação; nos animais, representa um mecanismo de defesa, através do qual células especializadas, chamadas **células fagocitárias**, englobam e destroem partículas estranhas e microrganismos invasores.

Os aspectos morfológicos da fagocitose têm sido estudados nas amebas gigantes, que se alimentam por este processo e cuja atividade fagocitária é tão grande que uma única ameba pode englobar 10 paramécios — seu alimento natural — em cinco minutos. Os paramécios chocam-se ao acaso com as amebas e ficam presos no extenso glicocálice, sendo fagocitados em seguida.

A fagocitose consiste na formação de um pseudópodo, que envolve gradualmente cada paramécio. Forma-se deste modo um vacúolo, o **fagosoma**, que é puxado pela atividade motora do citoesqueleto para a profundidade do citoplasma. O fagosoma vai se fundir com um ou mais lisosomas, ocorrendo então a digestão do material fagocitado pelas enzimas hidrolíticas dos lisosomas.

O glicocálice, que passa a ser a camada mais interna da membrana do fagosoma, é modificado pelas enzimas lisosômicas. Simultaneamente, verifica-se uma modificação na permeabilidade da membrana. Em relação à membrana plasmática, da qual

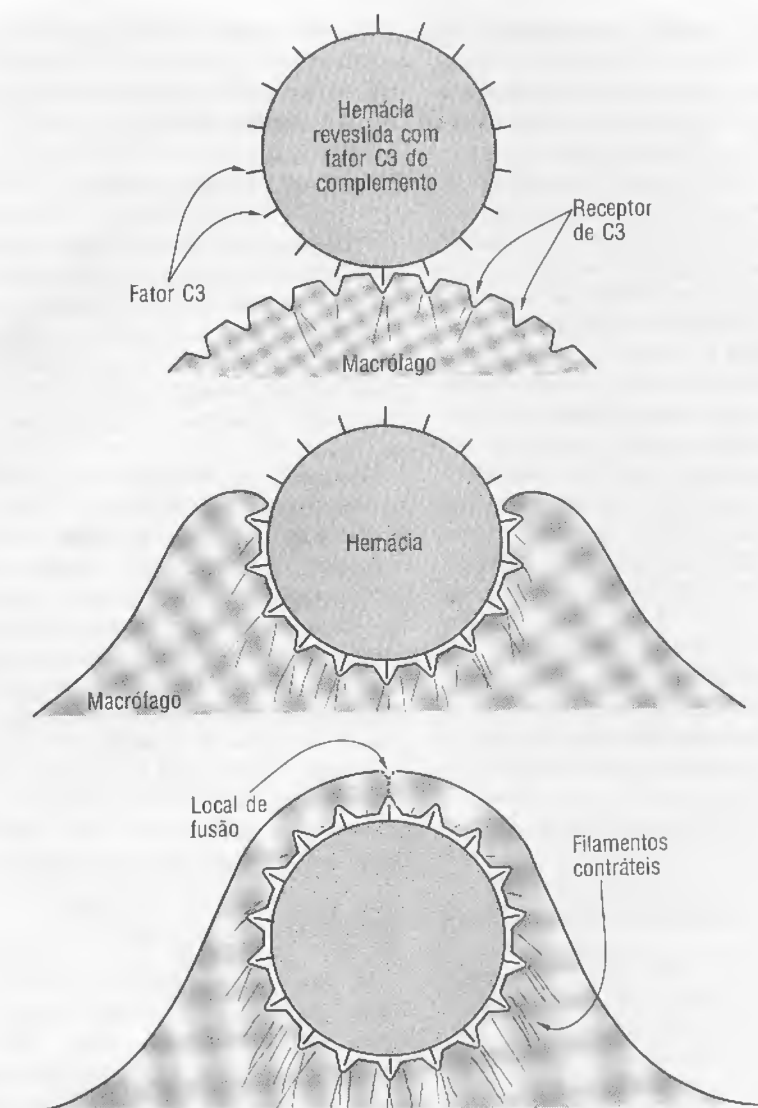


Fig. 5.12 Esquema mostrando que a fagocitose resulta da interação de moléculas específicas. O exemplo mostra hemácias experimentalmente revestidas pelo fator C3 do complemento (o complemento é um grupo de proteínas do plasma sangüíneo, com diversas funções). A combinação sucessiva das moléculas do fator C3 com os receptores pode ser comparada ao fechamento de um zíper. Desse modo, a hemácia é englobada num vacúolo. O receptor estimulado promove a polimerização de monômeros de actina do citosol, que vão formar microfilamentos contráteis. Baseado em Silverstein SC, Michl J, and Loike JD: *International Cell Biology 1980-1981*. Schweiger, H.G. (ed.) Springer, New York, 1981.

deriva, a membrana do fagosoma torna-se mais permeável à glicose e 100 vezes mais permeável à água.

É interessante notar que a membrana das amebas gigantes, que vivem em água doce, é pouco permeável à água. Mas esta permeabilidade aumenta quando a membrana passa a fazer parte do fagosoma, o que, naturalmente, facilita as trocas entre o material do fagosoma e a matriz citoplasmática da ameba.

A fagocitose é um processo seletivo, conforme pode ser observado no exemplo da fagocitose de paramécios pelas amebas, já mencionado. A primeira etapa, isto é, a fixação dos paramécios na superfície das amebas, deve-se à afinidade entre os paramécios e o glicocálice das amebas. Esta fase do processo, que consiste no reconhecimento dos paramécios pelos receptores da superfície da ameba, não é afetada pela temperatura, que tem efeito sobre a fase seguinte, de ingestão dos paramécios. Colocando-se amebas e paramécios em baixa temperatura, acumulam-se paramécios presos à superfície das amebas sem que haja fagocitose. Elevando-se a temperatura, esta se processa de imediato.

Nos mamíferos, a fagocitose é feita por células especializadas na defesa do organismo, como os macrófagos (Fig. 5.14). Todavia, conforme mostra a Fig. 5.15, vários microrganismos desenvolveram, durante a evolução, diversos mecanismos para escapar à morte intracelular após serem fagocitados.

Pinocitose: captação ativa de macromoléculas em solução

O termo **pinocitose** foi usado pela primeira vez para designar o englobamento de gotículas de líquido, observado em células cultivadas. Estas células emitem delgadas expansões do citoplas-

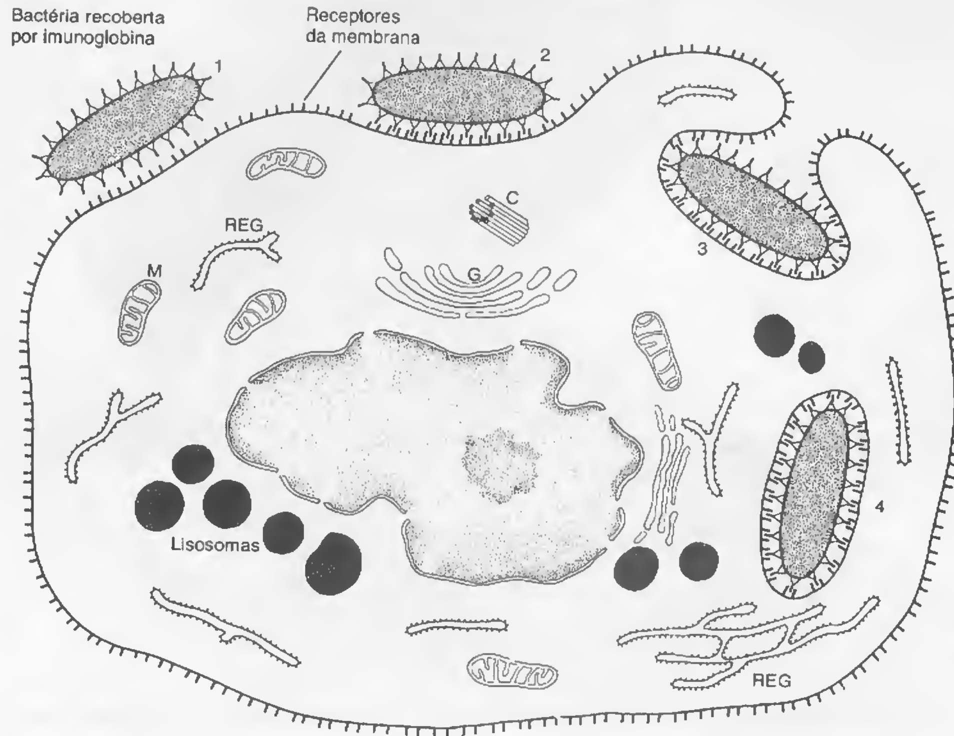


Fig. 5.13 Etapas (1-4) da fagocitose de uma bactéria já atacada por imunoglobulina. A superfície do macrófago tem receptores para o segmento Fc da imunoglobulina, que promovem a aderência da bactéria. Em 4 aparece a bactéria dentro de um **fagosoma**, onde poderá ser morta e, depois, digerida pelas enzimas dos lisosomas. M, mitocôndria; REG, retículo endoplasmático rugoso ou granular; C, centríolo; G, aparelho de Golgi. Reproduzido com permissão de Carneiro, J. Bases Celulares para a Fisiopatologia. *In*: Marcondes, M. *et al. Clínica Médica*. 3ª ed. Guanabara Koogan, Rio, 1984.

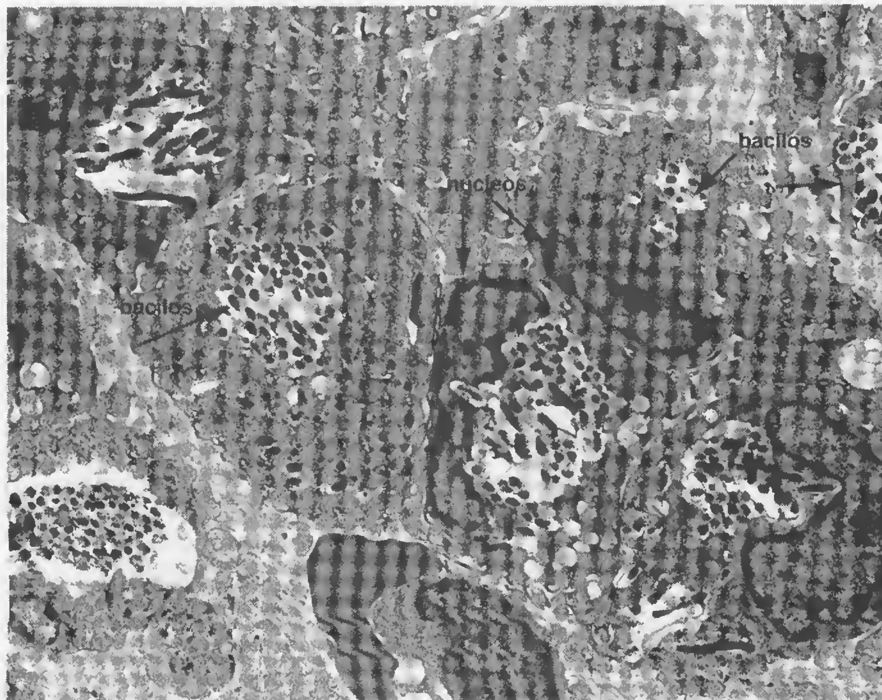


Fig. 5.14 Micrografia eletrônica mostrando macrófagos onde está se reproduzindo o *Mycobacterium leprae*, bacilo responsável pela hanseníase.

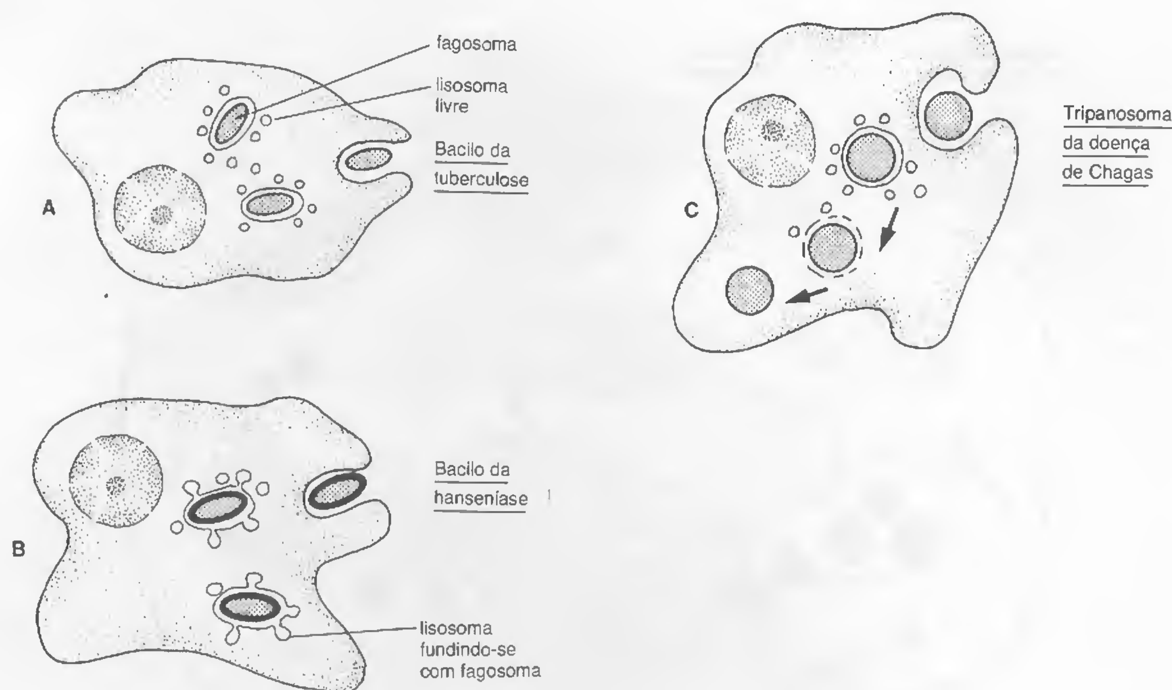


Fig. 5.15 Desenhos ilustrando três exemplos de mecanismos utilizados por microrganismos patogênicos (*pathos*, doença, e *genesis*, geração) fagocitados, para evitar serem atacados pelos lisosomas. **A**. Alguns microrganismos, como o bacilo da tuberculose, secretam uma substância que impede a fusão dos lisosomas com os fagosomas. **B**. Já o bacilo causador da hanseníase (lepra) se defende desenvolvendo uma cápsula resistente e impermeável às enzimas lisosômicas. **C**. Outro exemplo é dado pelo *Trypanosoma cruzi*, que, ao ser fagocitado, rapidamente digere a membrana que o envolve (membrana do fagosoma), tornando-se livre no citoplasma.

ma, como membranas ondulantes, que, ao se retraírem, englobam gotículas do meio de cultivo de até 1 μm de diâmetro. Formam-se assim vacúolos contendo líquido, que se aprofundam no citoplasma tornando-se cada vez menores, o que sugere uma transferência de líquido para a matriz citoplasmática. Nas culturas, muitas células exibem esse fenômeno.

No processo de pinocitose já descrito, formam-se longas projeções laminares da superfície celular, visíveis ao microscópio óptico, que dão origem a vesículas também grandes e de diâmetro muito variável. Todavia, essa modalidade de pinocitose não é de ocorrência geral, estando restrita a raros tipos celulares, principalmente nas culturas de células.

Na pinocitose mais freqüente, observada em grau variável em todas as células, ocorre a invaginação de uma área localizada da membrana plasmática, formando-se pequenas vesículas que são puxadas pelo citoesqueleto e penetram no citoplasma. Essas vesículas carregam líquido e são de tamanho uniforme, com 200 nm de diâmetro (Fig. 5.16). Em alguns casos, como nas células endoteliais dos capilares sangüíneos, as vesículas de pinocitose formadas num lado da célula atravessam o citoplasma e lançam seu conteúdo no outro lado da célula, servindo como transportadoras.

Na pinocitose **não-seletiva**, as vesículas englobam todos os solutos que estiverem presentes no fluido extracelular. Todavia, na maioria das células, a **pinocitose é seletiva** e é realizada em duas etapas. Na primeira, a substância a ser incorporada adere a receptores da superfície celular; na segunda, a membrana se afunda e o material a ela aderido passa para uma vesícula. Esta se destaca da superfície celular e penetra no citoplasma (Fig. 5.17). Um exemplo bem estudado de pinocitose seletiva é encontrado nas células precursoras das hemácias que incorporam transferrina, uma proteína plasmática transportadora do ferro que é usado para a síntese de hemoglobina. Contudo, só existe pinocitose em locais específicos de membrana, onde há receptores para as moléculas de transferrina. Essa pinocitose tem a vantagem de possibilitar a incorporação ao citoplasma de grandes quantidades de um tipo de molécula, sem a penetração concomitante de muita água.

Os cortes examinados no microscópio eletrônico mostram que as áreas da membrana onde se formam as vesículas da pinocitose seletiva apresentam prolongamentos finos e curtos, com o aspecto dos pêlos de uma escova. Quando a vesícula se destaca, sua superfície é irregular e filamentosa (Fig. 5.17). Por isso foi chamada de **vesícula coberta** *(coated vesicle)*. Estas vesículas foram isoladas, sua composição química estudada e seu aspecto com "coloração negativa" observado no microscópio eletrônico. A superfície da vesícula coberta apresenta um revestimento com o aspecto de uma malha pentagonal ou hexagonal (Fig. 5.18), constituída principalmente por moléculas da proteína ***clatrina***, responsável pelo aspecto filamentoso visto nos cortes. *In vitro*, mesmo na ausência de vesículas, as moléculas de clatrina se associam espontaneamente, sem gasto de energia, para formar estruturas esféricas constituídas por uma rede de malha penta ou hexagonal. Na presença de vesículas constituídas somente por membrana, a agregação de clatrina se dá de preferência em torno das vesículas. Isto demonstra que a membrana dessas vesículas possui receptores para moléculas da rede de clatrina. Nas células, observam-se filamentos de actina que se inserem na superfície das vesículas cobertas e participam do seu deslocamento dentro do citoplasma.

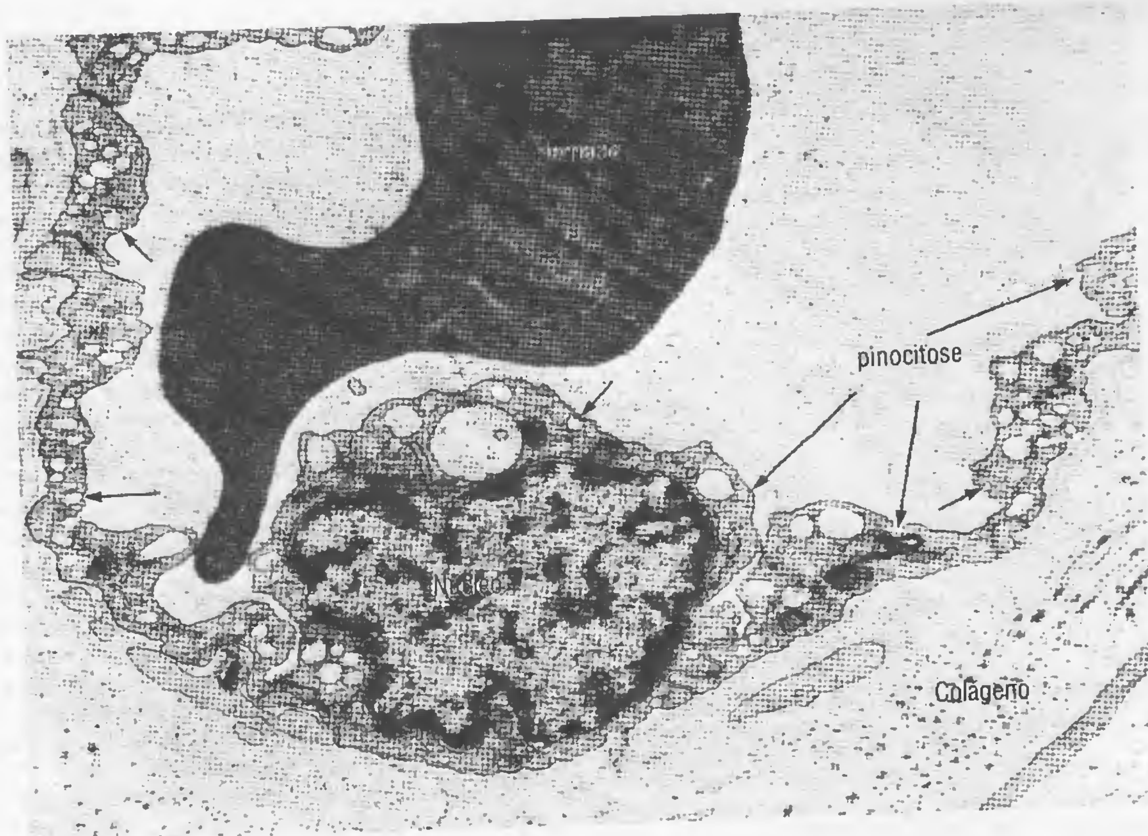


Fig. 5.16 Parede de vaso capilar sanguíneo mostrando células endoteliais com numerosas vesículas de pinocitose (*setas*). Eletromicrografia. Aumento: 18.000×.

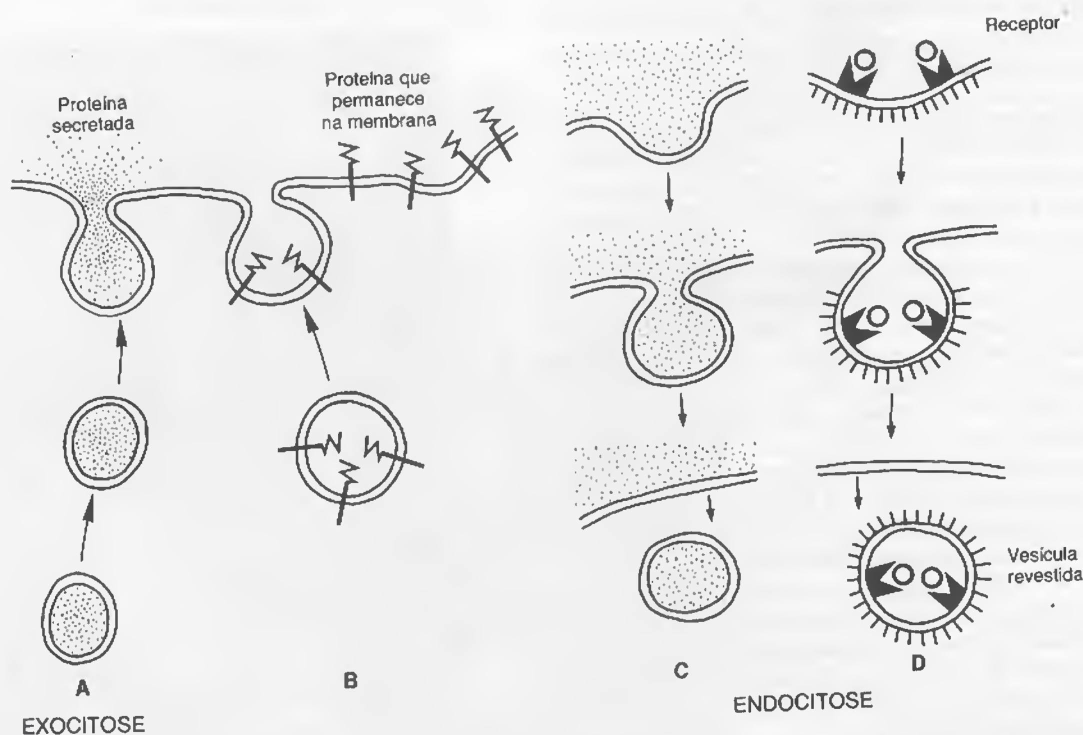


Fig. 5.17 Ilustrando exocitose e pinocitose. Em **A**, ocorre a extrusão (exocitose) de moléculas sintetizadas, como se observa na secreção de muitas glândulas endócrinas e exócrinas, na secreção da matriz extracelular etc. O desenho **B** mostra a exteriorização de proteínas e glicoproteínas constitutivas, que passam a fazer parte da membrana plasmática. Algumas dessas proteínas atuam como receptores. Em **C**, mostra-se a pinocitose não-seletiva ou de fase fluida. Nesse caso, a vesícula de pinocitose contém as moléculas dissolvidas no fluido extracelular. Em **D**, nota-se que a pinocitose é seletiva. Receptores da membrana ligam-se especificamente a certas moléculas, e o conjunto é interiorizado na célula. A endocitose mediada por receptores é facilitada pela aderência de **clatrina** e outras proteínas à superfície interna da membrana celular, onde se formam as vesículas. Por isso, elas recebem o nome de vesículas cobertas ou *coated vesicles*. Esse tipo de pinocitose é mais seletivo e mais eficiente, pois concentra as moléculas que serão introduzidas na célula.

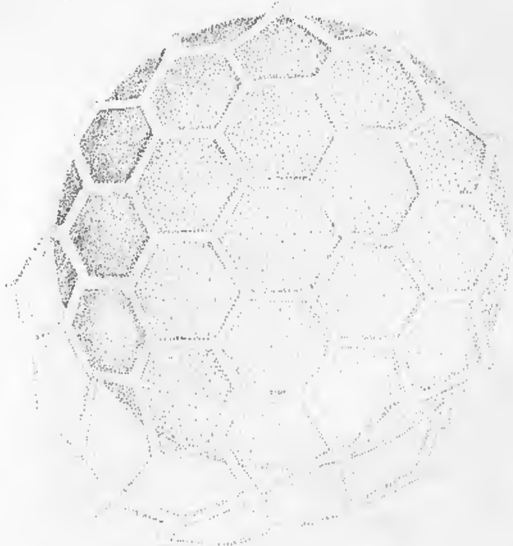


Fig. 5.18 Vesícula coberta ou *coated vesicle*, exibindo a capa constituída por uma rede contendo clatrina, em arranjo poligonal (quase sempre hexagonal). Para melhor visualização, a capa aparece destacada na parte superior do desenho. Reproduzido com permissão de Carneiro, J. Bases Celulares para a Fisiopatologia. *In*: Marcondes, M. *et al. Clínica Médica*, 3ª ed. Guanabara Koogan. Rio. 1984.

Os lisosomas são depósitos de hidrolases ácidas

As substâncias que penetram na célula por pinocitose ou fagocitose, bem como componentes celulares desgastados pelo uso, podem sofrer a ação de enzimas digestivas contidas em organelas denominadas **lisosomas**. Essas enzimas também podem ser secretadas para o meio extracelular.

Os lisosomas são corpúsculos geralmente esféricos de estrutura e dimensões muito variáveis. Cada lisosoma é envolvido por uma unidade de membrana (Fig. 5.19), contém enzimas hidrolíticas com atividade máxima em pH ácido e, por isso, genericamente denominadas de hidrolases ácidas.

Ao contrário das outras organelas descobertas graças aos microscópios óptico e eletrônico, os lisosomas foram identificados, pela primeira vez, pela técnica de centrifugação fracionada. Observou-se que era possível isolar da fração rica em mitocôndrias uma subfração que revelava atividade de hidrolases ácidas após tratamentos capazes de romper membranas.

Daí tirou-se a conclusão de que esta subfração deveria conter corpúsculos nos quais as enzimas estariam isoladas por membrana. Posteriormente — e graças sobretudo à técnica citoquímica para demonstração de fosfatase ácida, uma enzima dos lisosomas — foi possível a identificação dessas organelas através das microscopias óptica e eletrônica.

Os lisosomas parecem ser organelas existentes em todas as células eucariontes, pois já foram encontrados nas células das plantas, fungos e protozoários, além das células animais, onde foram descobertos.

Os lisosomas são ricos em enzimas digestivas para quase todas as macromoléculas biológicas, e as células seriam facilmente destruídas se as enzimas dos lisosomas não estivessem contidas numa organela envolta numa membrana. Não existe explicação satisfatória para a resistência da membrana lisosomal, frente às enzimas contidas nessa organela. O fato de que as enzimas lisosômicas são ativas em pH ácido, enquanto o pH do citoplasma é neutro, constitui uma proteção adicional contra os efeitos dessas enzimas sobre a célula normal, na ocorrência eventual de ruptura de lisosomas. O elenco de enzimas presentes nos lisosomas é variável de acordo com o tipo celular e depende da especialização funcional de cada célula.

As vesículas de fagocitose ou **fagosomas** fundem-se com um ou vários lisosomas, misturando-se assim o material a ser digerido com as enzimas lisosômicas. Na membrana dos lisosomas existe uma enzima que utiliza energia liberada de ATP para bombear prótons (H^+) para dentro dos lisosomas, estabelecendo assim um pH entre 4,5 e 5, ideal para a atividade das hidrolases ácidas.

Algumas vezes permanecem, nos lisosomas, depósitos de material que resistiu ao processo digestivo, os **corpos residuais**, que permanecem na célula por tempo variável, e, segundo alguns pesquisadores, podem ser transportados até a membrana plasmática, com a qual se fundem. Dessa forma, o seu conteúdo é jogado no exterior da célula por **exocitose**. Todavia, essa exocitose não parece ser muito freqüente, de modo que os corpos residuais se acumulam, com o decorrer do tempo, nas células de vida longa.

Em alguns tipos celulares que não se dividem, como os neurônios e as células do músculo cardíaco, os corpúsculos residuais não são eliminados, agregando-se e formando partículas gran-

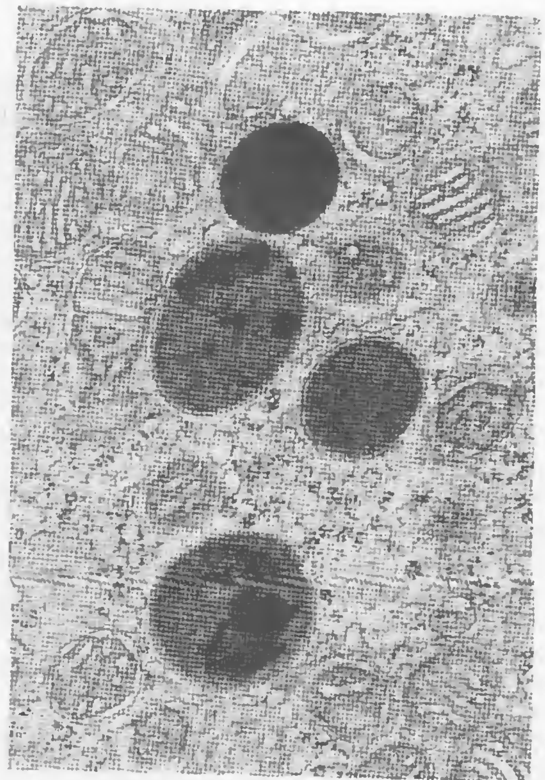


Fig. 5.19 Micrografia eletrônica de célula do córtex da glândula adrenal de camundongo. Os corpúsculos globosos e elétron-densos, com zonas mais escuras em seu interior, são lisosomas. Os dois lisosomas centrais mostram, nitidamente, as membranas limitantes. Aumento: 35.000 ×.

des, visíveis no microscópio óptico, contendo lipídios complexos de cor parda e chamados **grânulos de lipofuscina**. Esses grânulos aumentam de número com a idade.

Outras vezes, o acúmulo de material nos corpos residuais é conseqüência de um defeito hereditário dos lisosomas. Nesses casos falta uma ou várias das enzimas que normalmente existem nos lisosomas. Por exemplo, na doença de Pompe, cujo aparecimento se verifica nos primeiros anos de vida, todas as células, sobretudo as hepáticas e musculares, se carregam de grande quantidade de glicogênio. Nesta doença, os lisosomas são deficientes na enzima glicosidase, que degrada o glicogênio. Os acúmulos de glicogênio são mais acentuados no fígado e no músculo, porque nestes tecidos existe normalmente maior quantidade desse polissacarídeo. Há diversas outras doenças hereditárias em que a falta de certas enzimas lisosômicas pode produzir acúmulos de glicosaminoglicanas (mucopolissacarídeos) ou lipídios.

Na maioria das células eucariontes, observa-se a degradação de porções do citoplasma pela atividade das enzimas dos lisosomas. Esse processo, denominado **autofagia**, é provavelmente comum a todas as células eucariontes, tendo sido observado em células de animais, protozoários e células vegetais.

Ao microscópio eletrônico, a autofagia caracteriza-se pelo aparecimento de organelas, como mitocôndrias, cloroplastos, grânulos de secreção etc., no interior de vesículas cujas paredes são constituídas por uma membrana derivada do retículo endoplasmático liso. Estas vesículas são chamadas **vacúolos autofágicos** ou **autofagosomas** (Fig. 5.20).

Organelas alteradas ou que não são mais necessárias são envolvidas por membrana, que imediatamente se funde com diversos lisosomas primários, expondo assim o conteúdo do vacúolo à atividade hidrolítica das enzimas lisosômicas.

As organelas têm vida mais curta do que a própria célula, sendo continuamente renovadas, e admite-se que a autofagia tenha papel significativo na renovação de todas ou de algumas organelas.

Em certas condições fisiológicas, há um aumento da autofagia. Isso acontece, por exemplo, nas glândulas mamárias quando termina a lactação. Durante a gravidez, aumenta o número das células secretoras dessas glândulas, para produzir leite após o parto. Terminado o período de lactação, tem lugar a destruição autofágica dos restos de secreção e das organelas não mais necessárias. Esta autofagia leva à morte das células, cujo número se reduz drasticamente, retornando a glândula ao estado de repouso de antes da gravidez.

As enzimas lisosômicas algumas vezes também participam da digestão de moléculas extracelulares. Nestes casos, a membrana dos lisosomas se funde com a membrana plasmática, como o fazem os grânulos de secreção, e as enzimas são jogadas no meio extracelular. Por exemplo, os eosinófilos secretam enzimas lisosômicas nos locais onde ocorrem certos tipos de infecção. Mesmo em condições normais, pode haver secreção de enzimas dos lisosomas, como na absorção óssea que tem lugar durante o crescimento e na redução dos tecidos do útero, após o parto.

Microvilos são prolongamentos que aumentam a superfície de absorção das células

Nos metazoários existem células especializadas na absorção de substâncias diversas. Nos mamíferos, as células mais bem estudadas são as do intestino delgado e do rim. As células que revestem a superfície interna do intestino delgado são colunares, dispostas em camada única, e suas superfícies em contato com os alimentos apresentam numerosas digitações — os **microvilos** (Fig. 5.21). Cada microvilo ou **microvilosidade** é uma expansão do citoplasma recoberta por membrana e contendo numerosos microfilamentos de actina responsáveis pela manutenção da forma dos micro-

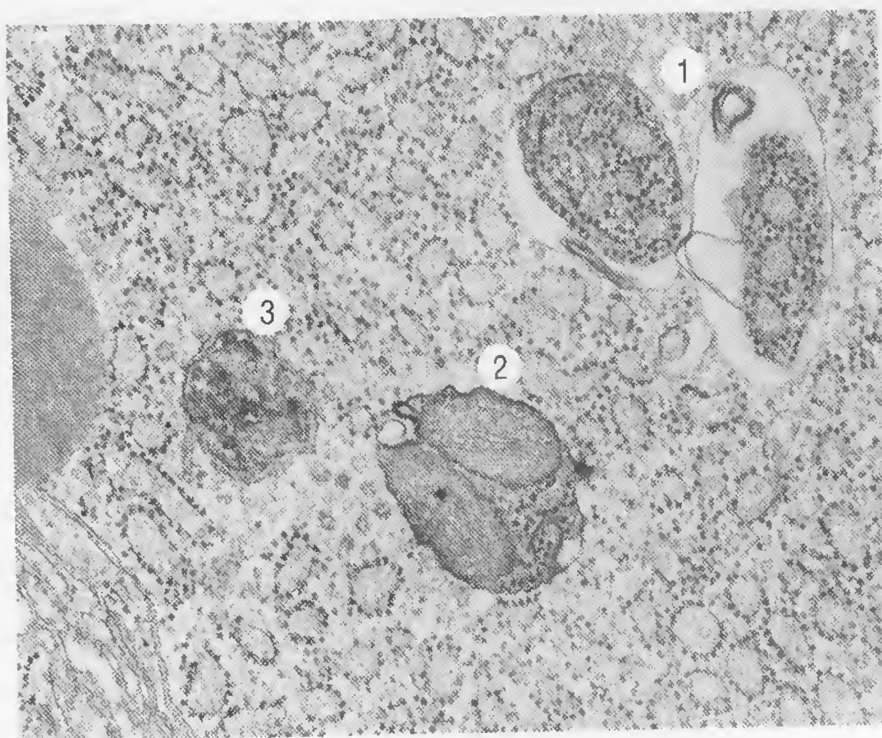


Fig. 5.20 Micrografia eletrônica de célula acinosa do pâncreas de rato. Aparecem diversos autofagosomas, que são lisosomas secundários, em diferentes etapas de digestão. Observar, em 1, duas porções de retículo endoplasmático rugoso segregadas do citoplasma por membrana e em início de alteração. Em 2, aparecem duas mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso em fase mais avançada de digestão. O processo está em sua fase final em 3, onde já não se reconhecem as organelas. Aumento: 45.000 ×.

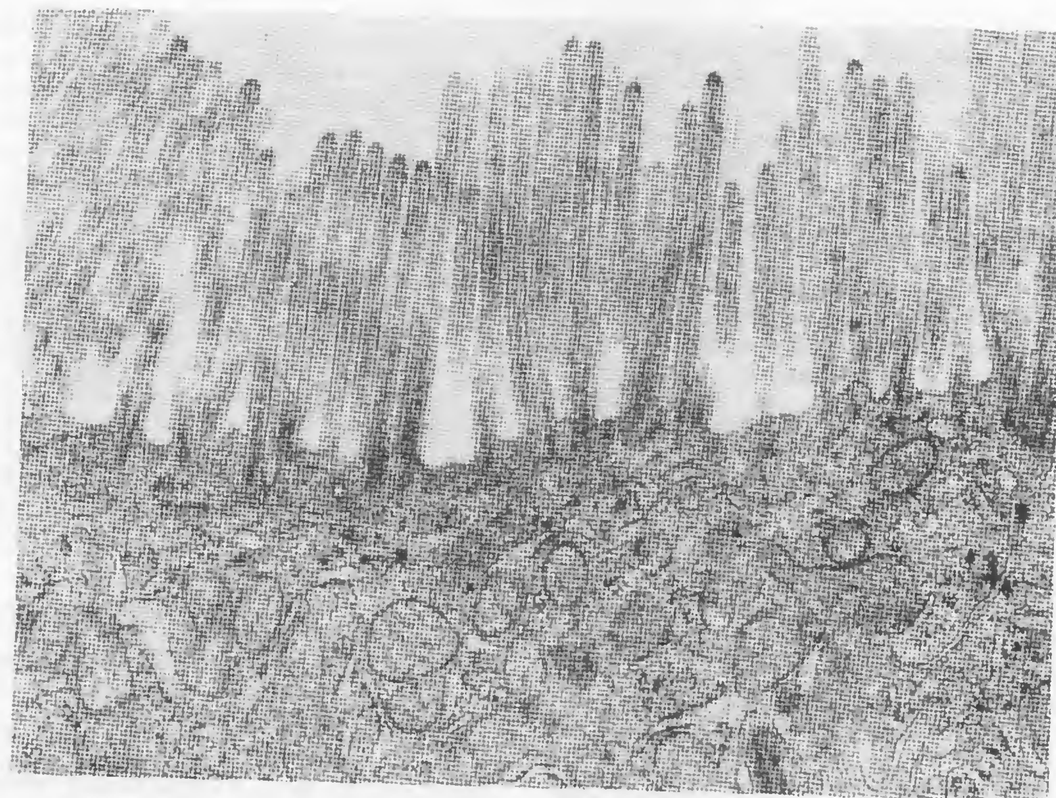


Fig. 5.21 Microvilos de células epiteliais do intestino delgado. Eletromicrografia. Aumento: 25.000 ×.

vilos; seu glicocálice é mais desenvolvido do que no resto da célula (Fig. 5.9). No intestino, a função dos microvilos é aumentar a área da membrana a fim de facilitar o transporte dos nutrientes da cavidade ou luz intestinal para dentro das células. Posteriormente, os nutrientes passam das células para o tecido conjuntivo e, daí, para os vasos sangüíneos e, em menor quantidade, para os linfáticos, distribuindo-se então por todo o organismo.

Os microvilos do epitélio intestinal são paralelos uns aos outros e formam uma camada muito regular na superfície intestinal, **a borda estriada**, visível ao microscópio óptico.

No rim, os microvilos são encontrados na superfície livre da camada única de células cúbicas que revestem os **túbulos contorcidos proximais**. Pela luz desses túbulos, passa um filtrado do plasma sangüíneo que vai dar origem à urina, mas que ainda contém muitas moléculas aproveitáveis. Nos túbulos contorcidos proximais, muitas destas moléculas são removidas do filtrado, passando para as células dos túbulos, de onde são posteriormente devolvidas ao sangue. Os microvilos dessas células são também organizados paralelamente entre si, formando uma **borda estriada** visível ao microscópio óptico. Os microvilos das células renais, como todos os microvilos, só podem ser individualizados ao microscópio eletrônico.

A maioria das células possui microvilos, embora não tão numerosos e organizados como os das células absorventes. Os microvilos encontrados nas células em geral são pequenos, de forma irregular, contêm menor número de microfilamentos e se distribuem irregularmente por toda a superfície celular.

Além de aumentarem a superfície celular, alguns microvilos possuem membranas que contêm moléculas especiais. Por exemplo, algumas enzimas da membrana das células do revestimento intestinal só existem nos microvilos, como as **dissacaridases** e **dipeptidases**, responsáveis pela etapa final da digestão de hidratos de carbono e proteínas, respectivamente.

Estereocílios são prolongamentos imóveis que aumentam a superfície de algumas células epiteliais

Os estereocílios são expansões longas e filiformes da superfície livre de certas células epiteliais (Fig. 5.22). São flexuosos e, apesar do nome, não possuem a estrutura nem a capacidade de movimento dos cílios verdadeiros.

Os estereocílios assemelham-se mais aos microvilos, destes se distinguindo por se ramificarem freqüentemente e apresentarem maior comprimento. Enquanto os microvilos são freqüentes em muitos tipos de células, os estereocílios são encontrados apenas em certas células epiteliais, como as que revestem o epidídimo e outros ductos do aparelho genital masculino. Os estereocílios aumentam muito a superfície das células, facilitando a absorção de água e outras moléculas.

Adesão entre as células por meio das CAMs, glicoproteínas transmembrana

Já foi mencionado neste capítulo que as células se reconhecem e se podem ligar umas às outras. Essa propriedade é importante nos mecanismos de desenvolvimento embrionário e no

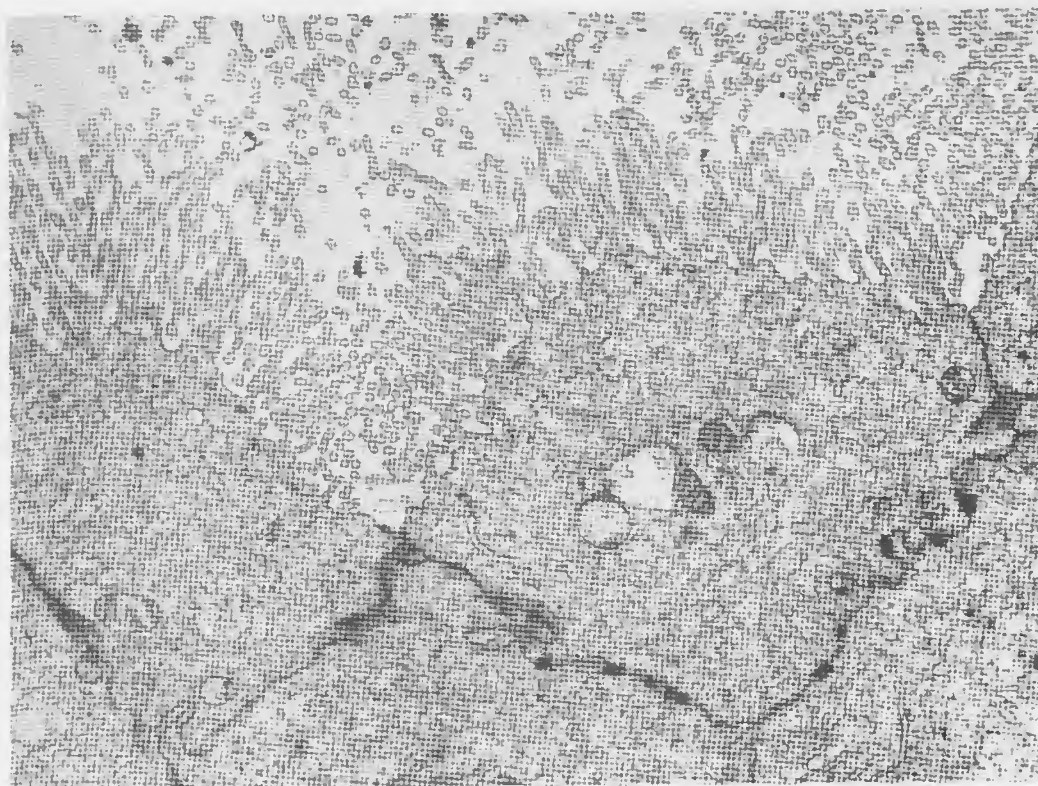


Fig. 5.22 Estereocílios. Células epiteliais do epidídimo. Notar que os estereocílios são flexuosos e, por isso, aparecem principalmente em cortes oblíquos. Eletromicrografia. Aumento: 12.000 ×.

estabelecimento e manutenção da estrutura dos tecidos, desde os animais mais primitivos até a espécie humana.

As glicoproteínas da membrana responsáveis pela adesão entre as células são denominadas CAMs (*cell adhesion molecules*). As CAMs são receptores da superfície especializados em reconhecer outras células e a elas aderir, para constituir os tecidos e órgãos. Freqüentemente, as células respondem à união das CAMs com pequenas modificações de comportamento, muitas vezes ocorrendo redução na freqüência de mitoses. A inibição por contato nas células em cultura, já descrita, é um exemplo.

Todas as CAMs são glicoproteínas integrais transmembrana, isto é, com uma extremidade da molécula exposta na superfície celular e a outra extremidade fazendo saliência no lado citoplasmático da membrana.

As **IgCAMs** constituem um grupo importante e suas moléculas lembram as dos anticorpos ou imunoglobulinas (Ig). Entre as IgCAMs podem ser mencionadas a C-CAM, encontrada na superfície dos hepatócitos (células do fígado), a Ng-CAM, dos neurônios e células da glia (a glia ou neuróglia é constituída de células que apóiam, isolam eletricamente e têm outras funções relacionadas com a atividade do tecido nervoso), a N-CAM, que participa da adesão dos neurônios, e a I-CAM, encontrada em diversos tipos celulares. A I-CAM dos leucócitos (glóbulos brancos do sangue) participa da adesão temporária dos leucócitos com as células endoteliais dos vasos sangüíneos, como parte do processo inflamatório. Notar que, nesse caso, a adesão é temporária, ao contrário do que geralmente acontece nos adultos, onde as CAMs formam adesões duradouras. Também nos processos de cicatrização das feridas e na regeneração de tecidos, as CAMs formam adesões temporárias, que se desmancham e refazem num processo dinâmico. O mesmo dinamismo acontece durante o desenvolvimento embrionário, para possibilitar os movimentos celulares necessários à formação da estrutura definitiva dos diversos tecidos e órgãos.

As **caderinas** constituem outro grupo de CAMs, porém, ao contrário das IgCAMs, são dependentes dos íons Ca^{2+}. As caderinas mantêm a adesão entre as células nas concentrações normais de Ca^{2+} no meio extracelular, mas perdem a adesividade quando a concentração desse íon é muito baixa.

Quando as células normais se transformam em células malignas, perdem a adesividade, separando-se umas das outras. As células malignas soltas são levadas pelo sangue ou pela linfa, produzindo tumores à distância, as **metástases**.

Mesmo as CAMs de células normais podem participar de processos patológicos. Um exemplo é a afinidade do vírus da poliomielite pelos neurônios. Esses vírus se ligam a CAMs de neurônios e, assim, penetram nessas células.

As células também aderem à matriz extracelular, o que será explicado no Cap. 12.

Estruturas especializadas asseguram a junção celular, vedação do espaço intercelular e comunicação entre células

Muitas vezes, as células acham-se unidas umas às outras e à matriz extracelular graças a estruturas juncionais, que serão descritas a seguir, e que podem ser divididas em três grupos: 1.º, estruturas cuja função primária é unir fortemente as células umas às outras ou à matriz extracelular (**desmosomas** e **junções aderentes**); 2.º, estrutura que promove a vedação entre as células (**zônula**

oclusiva); e 3.°, estrutura que estabelece comunicação entre uma célula e outra (**nexos, junção comunicante** ou ***gap junction***).

Desmosoma

Cada desmosoma tem a forma de uma placa arredondada e é constituído pelas membranas de duas células vizinhas (Fig. 5.23). No desmosoma, o espaço de 15 a 20 nm existente entre as membranas permanece inalterado, mas aí surge um material filamentoso ou granular mais denso aos elétrons (Fig. 5.24). Nos desmosomas, nota-se uma camada amorfa, elétron-densa, na face citoplasmática de cada membrana, chamada **placa do desmosoma**. Nesta placa se inserem filamentos intermediários de queratina, que se aprofundam no interior da célula (Fig. 5.24). Deste modo, os desmosomas são locais onde o citoesqueleto se prende à membrana celular e, como as células aderem umas às outras, forma-se um elo de ligação do citoesqueleto de células vizinhas. A natureza dos filamentos intermediários que se prendem aos desmosomas depende do tipo celular. Nas células epiteliais são constituídos de queratina, mas, nas células musculares do coração, são constituídos de vimentina.

A capacidade dos desmosomas para prender células vizinhas depende da presença de caderinas nessas membranas. Por isso, o desmosoma só tem poder de fixar as células quando a concentração de Ca^{2+} no espaço extracelular é normal. Baixas concentrações desse íon causam a separação das células.

Os desmosomas são muito freqüentes nas células submetidas a trações, como as da epiderme, do revestimento da língua e esôfago, e as células do músculo cardíaco. Formam-se com muita facilidade nas células mantidas em cultura e desaparecem nas que sofrem transformação maligna, tanto *in vivo* como nas culturas.

A composição molecular dos desmosomas é complexa, com a participação de diversas proteínas, como as **desmoplaquinas I e II**, glicoproteínas encontradas nas placas. Os filamentos intermediários ligam-se às desmoplaquinas por meio de outras proteínas, como a **desmocalmina** e a **queratocalmina**. As glicoproteínas **desmogleína** e **desmocolinas** são caderinas, glicoproteínas integrais da membrana, que prendem as membranas celulares na altura do desmosoma e também contribuem para a estrutura da placa. A desmogleína e as desmocolinas são proteínas transmembrana que fazem saliência tanto na superfície externa como na superfície citoplasmática da membrana.

As células dos epitélios apóiam-se em uma membrana não celular, chamada lâmina basal, que separa o epitélio do tecido conjuntivo. A face das células epiteliais em contato com a lâmina basal apresenta estruturas parecidas com os desmosomas, porém denominadas **hemidesmosomas** por não possuírem a metade correspondente à outra célula epitelial (Fig. 5.25). Apesar de seu aspecto morfológico semelhante a meio-desmosoma, os hemidesmosomas apresentam diferenças moleculares em relação aos desmosomas. Os hemidesmosomas contêm desmoplaquinas, mas não contêm desmogleína, aderindo às lâminas basais por meio de moléculas protéicas da classe das integrinas (v. Cap. 12).

Existe um grupo de doenças da pele humana, onde aparecem bolhas, denominadas genericamente de pênfigo. Em certos tipos de pênfigo, detectou-se no sangue dos pacientes anticorpos contra caderinas dos desmosomas. Nestes casos, a desorganização dos desmosomas, pela alteração de suas proteínas, causa o afastamento das células da epiderme e a penetração de líquido vindo do te-

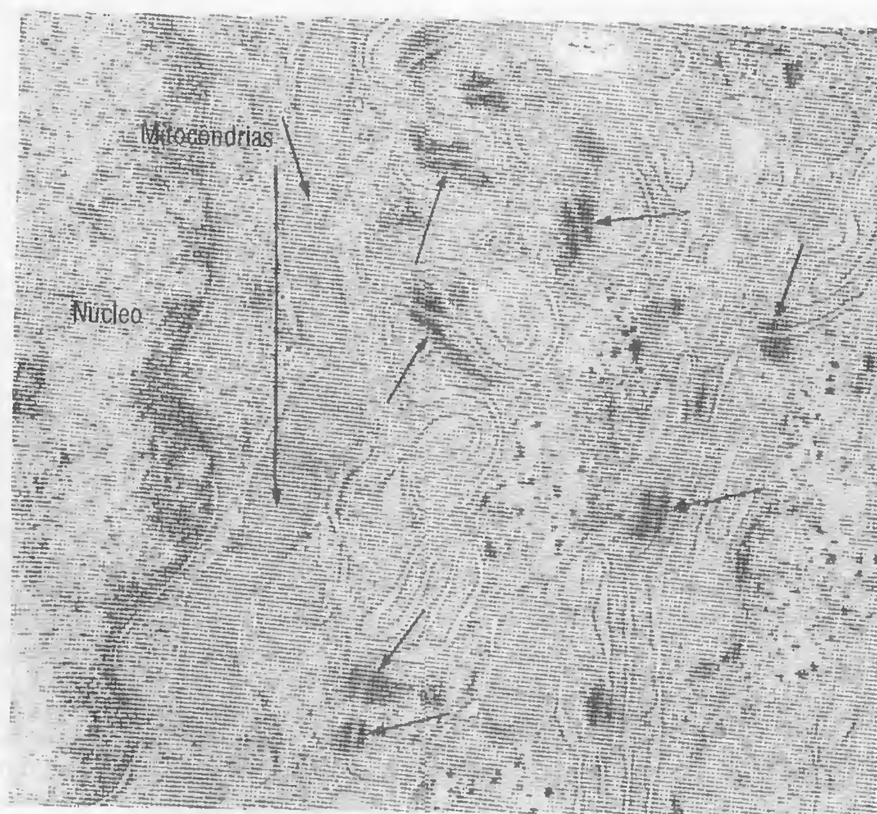


Fig. 5.23 Eletromicrografia de interdigitações que prendem as células da epiderme umas às outras. Aparecem também numerosos desmosomas (*setas*). Aumento: 36.000 ×.

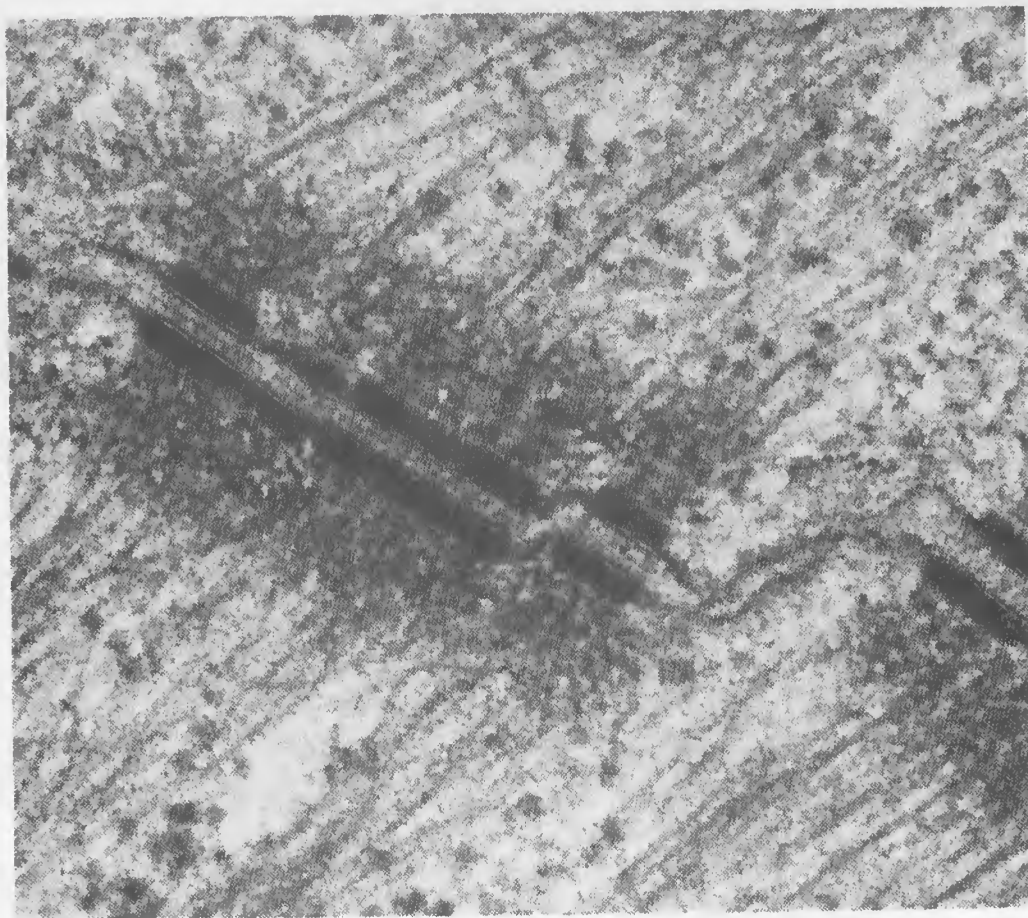


Fig. 5.24 Desmosoma. Eletromicrografia de células epiteliais de revestimento. Observe também os numerosos tonofilamentos (um tipo de filamento intermediário, constituído de queratina) no citoplasma das duas células. Aumento: 100.000 ×.

cido conjuntivo subjacente. Os desmosomas de outros tecidos que não a epiderme não mostram alterações nesses doentes, sugerindo haver diferenças nas proteínas que constituem os desmosomas.

Junção aderente

É uma formação encontrada em diversos tecidos. Em certos epitélios de revestimento, circunda a parte apical das células, como um cinto contínuo (zônula aderente), sendo particularmente desenvolvida no epitélio colunar simples com borda estriada, encontrado na mucosa do intestino. Além da forma de cinto, a junção aderente ocorre também com a forma circular ou oval, como os desmosomas. A junção aderente apresenta, nos cortes, um material granuloso e elétron-denso no espaço intercelular, semelhante ao observado nos desmosomas. Na altura da junção aderente existe deposição de material amorfo na face citoplasmática de cada membrana celular, formando placas, onde se inserem microfilamentos de actina que fazem parte do citoesqueleto e são contráteis. Todavia, o material amorfo que forma as placas das junções aderentes é menos compacto do que o observado nas placas dos desmosomas.

As junções aderentes, como os desmosomas, também são sensíveis aos níveis de íons Ca^{2+}, sendo desorganizadas quando a concentração desse íon é muito baixa, o que acarreta a separação das células.

No caso das células colunares do epitélio intestinal, a junção aderente promove a adesão entre as células e oferece um local de apoio para os microfilamentos que penetram nos microvilos das células epiteliais com borda estriada.

Zônula oclusiva

É uma faixa contínua em torno da porção apical de certas células epiteliais, que veda total ou parcialmente o trânsito de íons e moléculas por entre as células. Deste modo, as substâncias que passam pela camada epitelial o fazem através das células, sendo submetidas ao controle celular. Outra função da zônula oclusiva, também chamada **junção oclusiva**, é permitir a existência de potenciais elétricos diferentes, conseqüência de diferenças na concentração iônica entre as duas faces da camada epitelial. Isto seria impossível se houvesse passagem livre de íons por entre as células. Trata-se, assim, de uma estrutura responsável pela formação de compartimentos funcionalmente separados, muitas vezes constituídos por camadas epiteliais com junções oclusivas bem desenvolvidas.

A Fig. 5.26 mostra a estrutura da zônula oclusiva. Em corte, ela aparece como uma região onde os folhetos externos das membranas plasmáticas das duas células vizinhas se fundem.

Complexo juncional

Está presente em vários epitélios próximo à extremidade celular livre, sendo constituído dos seguintes elementos: zônula

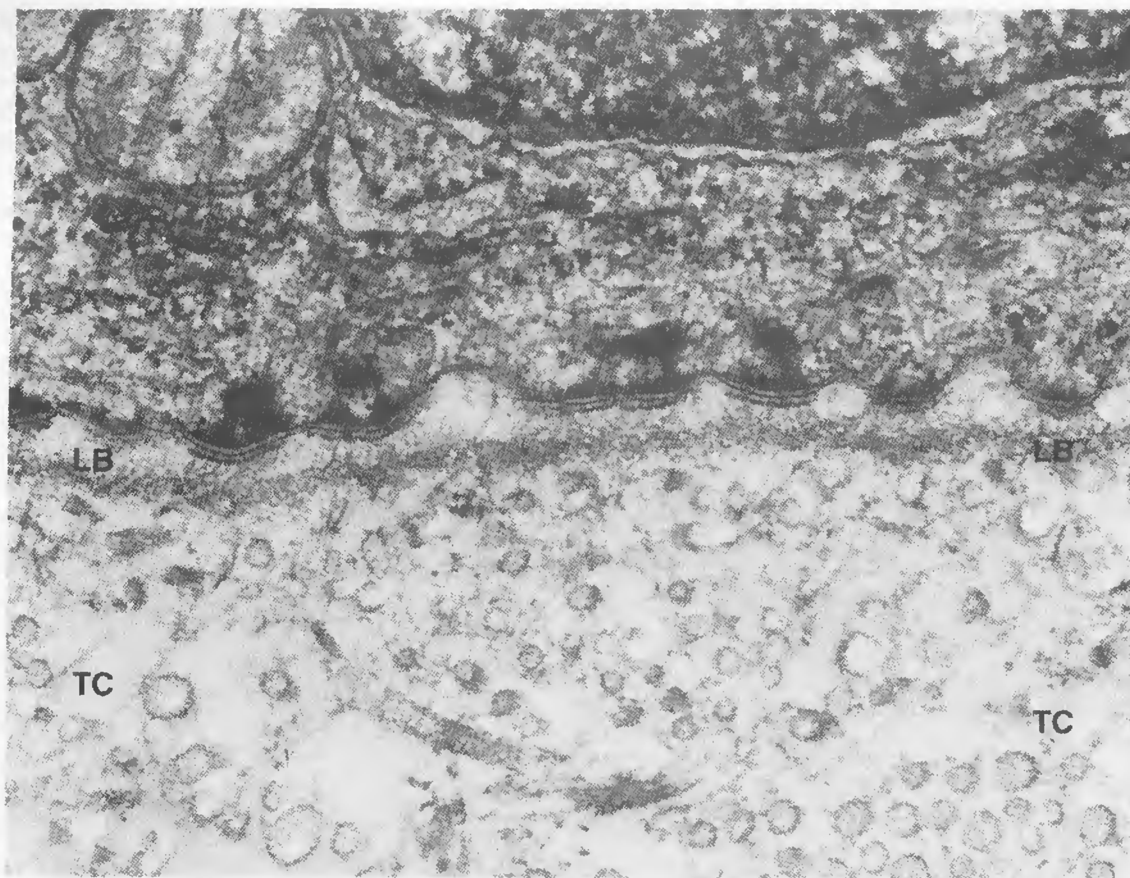


Fig. 5.25 Eletromicrografia da parte basal de uma célula epitelial de revestimento, em contato com o tecido conjuntivo (TC). Aparecem diversos hemidesmosomas unindo a célula ao tecido conjuntivo, através da lâmina basal (LB). Existe material filamentoso prendendo cada hemidesmosoma à lâmina basal. Pele de camundongo. Aumento: 80.000 ×.

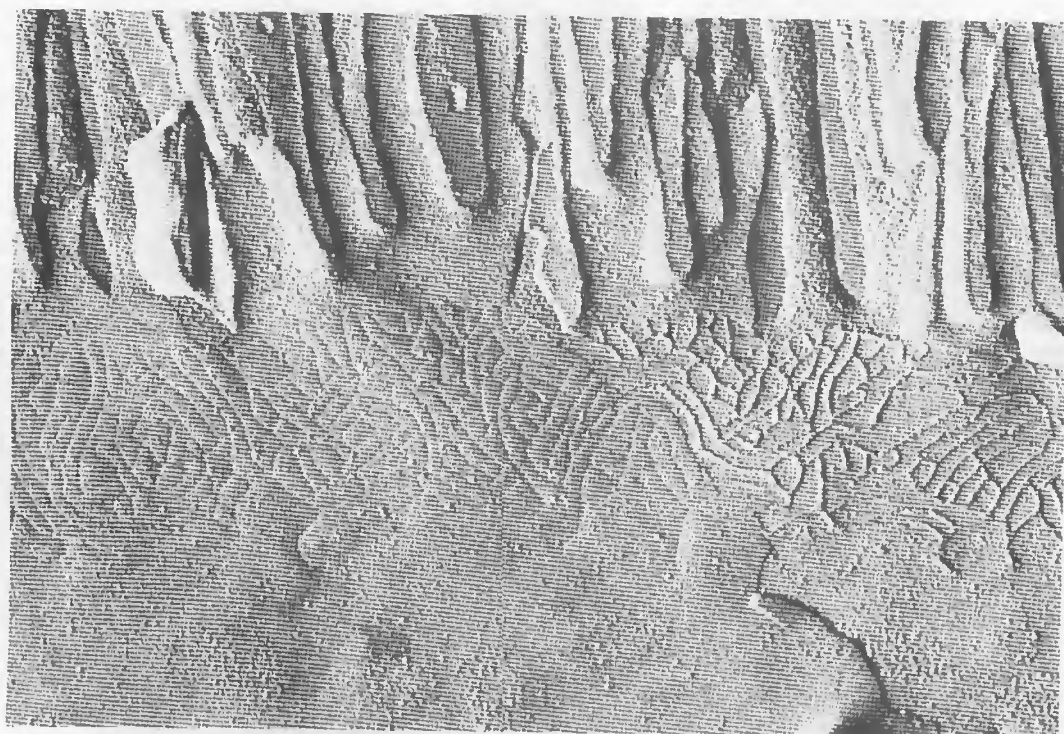


Fig. 5.26 Microscopia eletrônica de réplica de célula do revestimento do intestino delgado de rato preparada por criofratura. Na região da zônula oclusiva observa-se uma rede de saliências de uma lâmina da membrana (parte esquerda da figura) que correspondem às depressões vistas na parte esquerda da figura. Aumento: 68.000 ×. (Cortesia de A. Martinez-Palomo.)

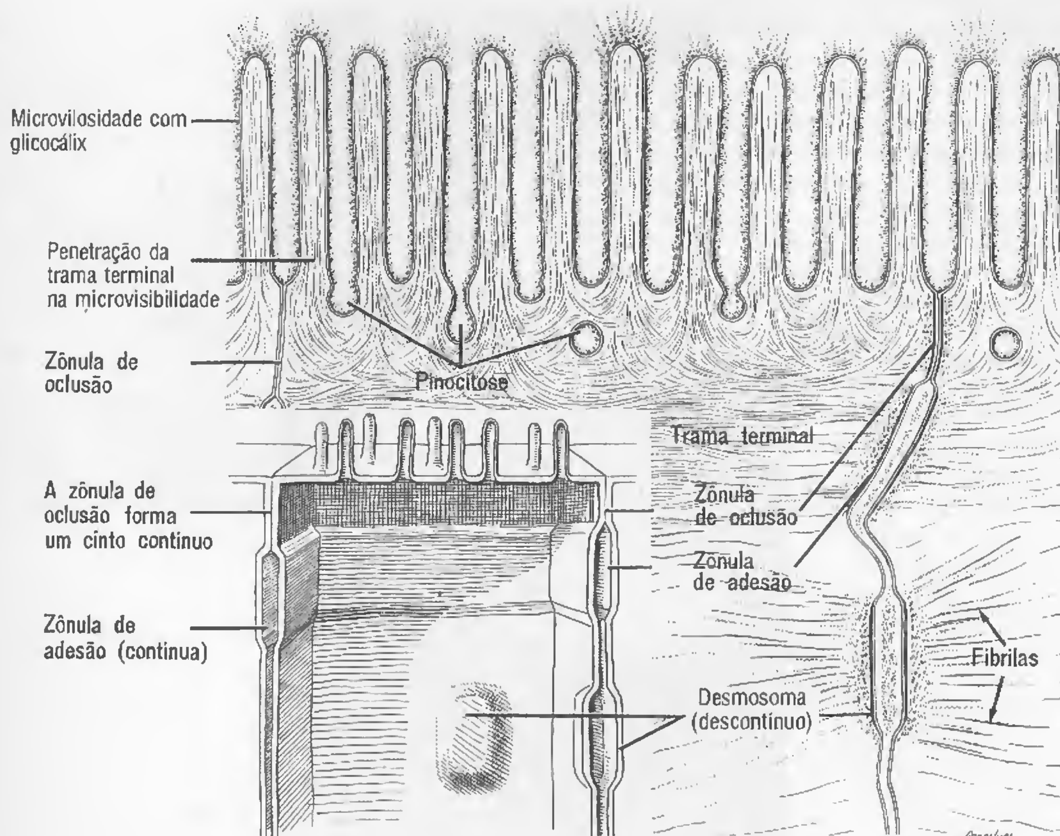


Fig. 5.27 Esquemas do complexo juncional existente entre as células epiteliais do intestino delgado.

oclusiva, junção (ou zônula) aderente e uma fileira de desmosomas (Figs. 5.27 e 5.28). O complexo juncional é uma estrutura de adesão e vedação. Nas células do epitélio colunar simples com borda estriada do intestino, existe, na altura do complexo juncional, uma condensação de filamentos, contendo actina, miosina e outras proteínas, que recebe o nome de **trama terminal**. Os filamentos da trama terminal se inserem na zônula de adesão e se continuam com os filamentos que penetram nos microvilos da borda estriada. Os filamentos da trama terminal são contínuos também com os filamentos do resto do citoplasma, participando assim do citoesqueleto.

Junção comunicante

Também chamada **nexos, junção em hiato** ou ***gap junction*** (Fig. 5.29), é de ocorrência muito freqüente, tendo sido observada entre as células epiteliais de revestimento, epiteliais glandulares, musculares lisas, musculares cardíacas e nervosas. Trata-se de uma estrutura cuja função principal é estabelecer comunicação entre as células, permitindo que grupos celulares funcionem de modo coordenado e harmônico, formando um conjunto funcional.

Na junção comunicante, as membranas das células estão separadas por 2 nm apenas. Cada junção — em geral com a forma circular — é constituída por um conjunto de tubos protéicos paralelos que atravessam as membranas das duas células. Cada tubo é formado pela aposição de dois tubos menores, os **conexons**, pertencentes a cada uma das células vizinhas. O conexon é constituído por 6 unidades protéicas. O diâmetro do tubo é de 7 nm e seu poro ou canal, hidrofílico, é da ordem de 1,0 a 1,4 nm, o que permite a passagem de moléculas de até 1.200 dáltons.

Através das junções comunicantes podem passar de célula para célula, por distâncias apreciáveis, substâncias naturais diversas como nucleotídeos, aminoácidos e íons. Todavia, os poros das junções comunicantes não permitem a passagem de macromoléculas como proteínas e ácidos nucléicos. Foi demonstrado que o AMP cíclico (um mensageiro intracelular) produzido numa célula em resposta à ação hormonal passa pelas junções comunicantes, promovendo resposta nas células vizinhas. Isto evidencia que essas junções podem coordenar e ampliar a resposta de grupos celulares a estímulos fisiológicos. As junções comunicantes podem passar de um estado de pouca permeabilidade a um estado de grande permeabilidade e, desse modo, abrem ou fecham a comunicação entre as células (Fig. 5.30).

Onde se originam as moléculas que constituem as membranas celulares?

Os diversos sistemas de membrana intracelulares e a membrana plasmática, com suas especializações, são formados por diversos tipos de moléculas lipídicas, principalmente fosfolipídios, e por uma grande variedade de proteínas. Essas proteínas têm funções enzimáticas, receptoras, de aderência e outras, indispensáveis para as atividades funcionais das membranas.

Os lipídios são sintetizados no retículo endoplasmático liso, e a transferência das moléculas lipídicas ocorre por mais de um

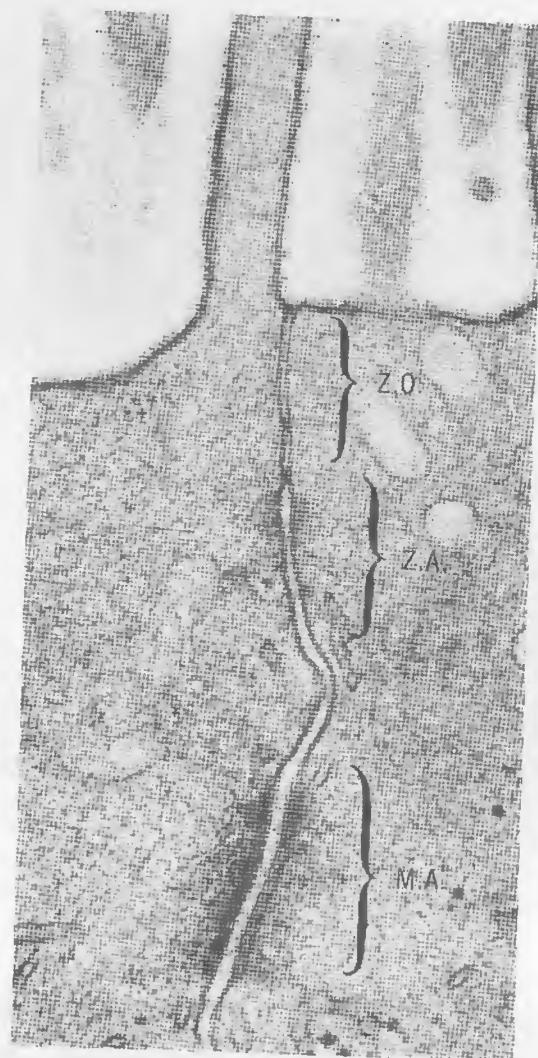


Fig. 5.28 Eletromicrografia do complexo juncional. ZO, *zonula occludens*; ZA, *zonula adherens*; MA, ou D, *macula adherens* ou desmosoma. Aumento: 80.000 ×.

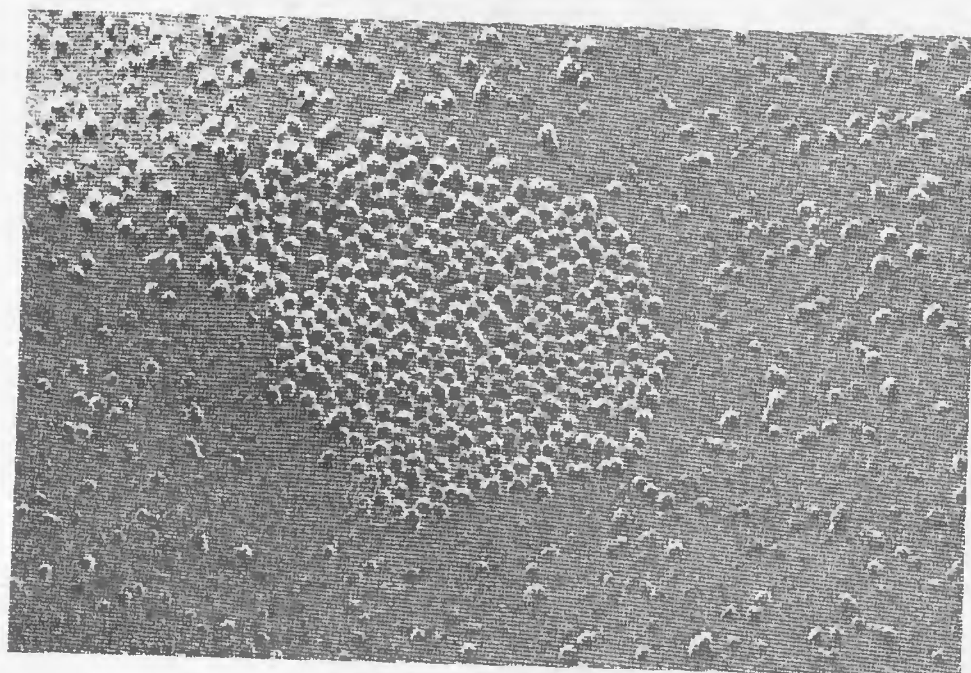


Fig. 5.29 Micrografia eletrônica da réplica de uma junção comunicante criofraturada, mostrando a face *P* da membrana de uma das células. Observe que há um acúmulo de partículas globulares aderentes à face *P* da membrana. A face *E*, que não aparece nesta figura, contém depressões onde se encaixam as partículas da face A. Preparado de célula trofoblástica de embrião de rato. Aumento: 190.000 ×. (Cortesia de A. Martinez-Palomo.)

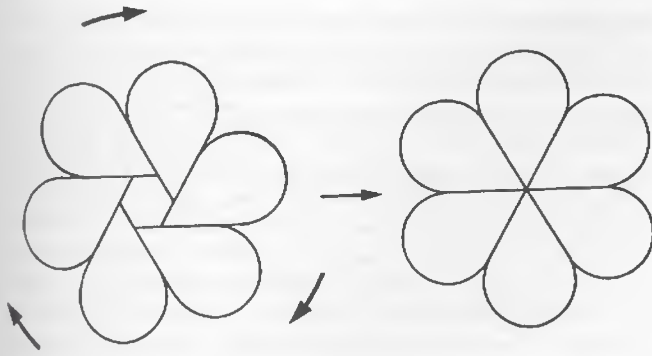


Fig. 5.30 Desenho esquemático mostrando o modelo da junção comunicante ou *gap junction*, no seu estado aberto (à esquerda) e no estado completamente fechado (à direita). Há um deslizamento das moléculas protéicas da junção, que fecha o orifício central pelo qual as células contíguas se comunicam.

mecanismo. Essas moléculas podem migrar, partindo da membrana do retículo endoplasmático liso para membranas que sejam contínuas com as desse retículo. É por esse processo que os lipídios passam do retículo liso para o rugoso. Muito freqüentemente, a transferência se dá por meio de vesículas que se destacam do retículo liso ou rugoso e são levadas pelo citoesqueleto para outros compartimentos, com os quais se fundem. Outro meio de transferência é representado por proteínas especiais do citosol que se combinam com moléculas lipídicas do retículo liso e as transferem para a membrana de outros compartimentos. Um exemplo é o transporte de moléculas de fosfolipídios da membrana do retículo liso para a membrana dos peroxisomas.

As proteínas são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e, geralmente, são transportadas por vesículas que passam pelo aparelho de Golgi (Fig. 5.31). Assim, as proteínas chegam à membrana plasmática, e a extremidade da molécula protéica que estava dentro da vesícula, passa para a superfície da célula.

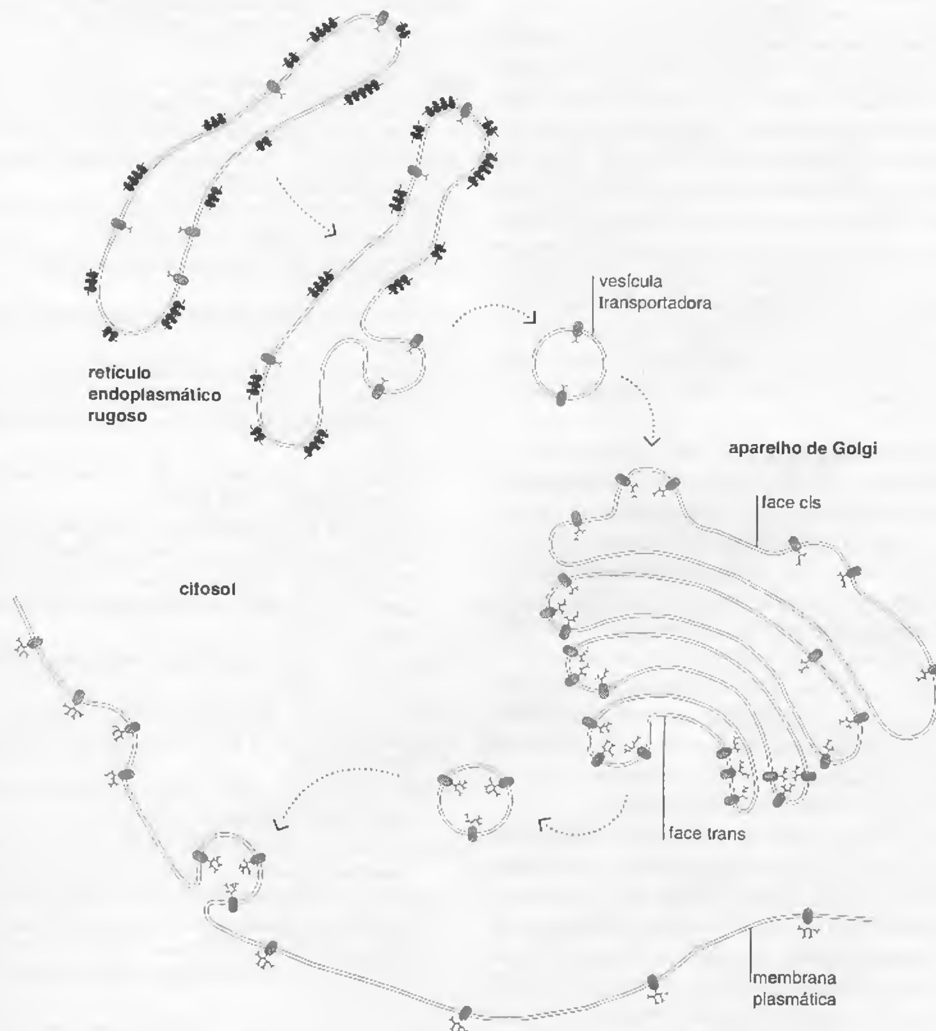


Fig. 5.31 As proteínas da membrana plasmática são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso. O exemplo mostra moléculas de glicoproteínas, cuja cadeia glicídica se inicia no retículo, sendo aumentada no aparelho de Golgi. Note que a vesícula que leva as moléculas de glicoproteínas leva também os fosfolipídios onde elas estão inseridas. Observe, ainda, que o interior da vesícula e as cisternas do aparelho de Golgi e do retículo endoplasmático são equivalentes à superfície externa da célula. A cadeia glicídica que inicialmente está localizada no interior dos compartimentos mencionados passa para a face externa da membrana plasmática.

Ao lado da movimentação das novas moléculas sintetizadas, existe um intercâmbio de moléculas da membrana plasmática, quando ocorre a endocitose. Muitas moléculas que chegam à membrana plasmática levadas por vesículas são moléculas recicladas, e não, necessariamente, moléculas novas. Existe um fluxo de moléculas transportadas por vesículas nos dois sentidos: da membrana plasmática para o interior da célula e de compartimentos citoplasmático para a membrana plasmática.

Sumário

Pela atividade da membrana plasmática, as células mantêm estável a composição molecular e iônica do meio intracelular, transferindo para fora as moléculas e íons desnecessários e introduzindo no citoplasma aquilo de que a célula necessita. A membrana contém macromoléculas protéicas específicas com grande afinidade para moléculas produzidas por outras células e que servem como sinais químicos de comunicação. Isto possibilita a vida das células em sociedade, formando organismos complexos.

Todas as membranas celulares têm estrutura molecular básica semelhante. São constituídas por uma bicamada lipídica, com moléculas protéicas inseridas e fazendo saliências numa face ou nas duas faces da membrana. Nas condições de temperatura do corpo, a membrana é um fluido lipoprotéico, gozando as moléculas protéicas de grande mobilidade lateral, no plano da membrana, porém sem mobilidade em outra direção. Existe nítida assimetria entre as duas faces das membranas. Na membrana plasmática, a face externa é rica em glicoproteínas receptoras, enquanto a face interna, no lado citoplasmático, possui proteínas que se ligam de modo reversível aos filamentos do citoesqueleto. Açúcares ligados a proteínas, a glicosaminoglicanas e a lipídios da face externa da membrana formam uma camada contínua, de espessura variável, em volta das células: o glicocálice.

Muitas moléculas penetram nas células, sem consumo de energia, pelo processo de difusão passiva. *Outras são* transportadas ativamente, *isto é, com gasto de energia. Existe ainda o processo de* difusão facilitada, *pelo qual a substância atravessa a membrana, sem consumo de energia, graças às moléculas de* permeases.

A transferência de macromoléculas em quantidade para dentro da célula ou endocitose *é feita por* fagocitose, pinocitose não-seletiva *e* pinocitose seletiva. *O trânsito em sentido inverso — isto é, para fora da célula — tem o nome genérico de* exocitose. *Na pinocitose seletiva, as macromoléculas a serem transportadas se prendem a receptores da membrana. Forma-se então uma vesícula encapada que, ao se destacar da membrana, está revestida por uma malha de* clatrina e outras proteínas.

As vesículas de endocitose podem-se fundir com lisosomas, *organelas ricas em enzimas digestivas, que atacam as macromoléculas introduzidas nas células. Outra função dos lisosomas é digerir, nos* autofagosomas, *partes da célula que perderam o significado funcional. Algumas vezes, as enzimas lisosômicas são secretadas e vão digerir macromoléculas da matriz extracelular.*

Muitas células animais apresentam expansões digitiformes da superfície: os microvilos *ou* microvilosidades, *que aumentam muito a superfície celular, sendo numerosos nas células especializadas na absorção, como as do revestimento intestinal.*

Na maioria dos tecidos, as células se prendem umas às outras através de modificações de suas membranas, conhecidas coletivamente como junções celulares. *Muitas vezes, a função principal destas estruturas é apenas a aderência entre as células, como acontece com os* desmosomas; *outras vezes seu papel é vedar o espaço intercelular, impedindo o trânsito molecular extracelular de tal modo que a passagem tem que ser feita por via intracelular e, portanto, sob o controle das próprias células. A especialização da membrana para constituir esta estrutura de vedação chama-se* zônula oclusiva *ou* zônula de oclusão. *Há também, em alguns locais mais restritos, modificações das membranas de células adjacentes para permitir a passagem de uma célula para a outra, de íons e moléculas pequenas, que transferem informações através destes sinais químicos, integrando a atividade de conjuntos celulares. Esses conjuntos apresentam acentuada unidade funcional, porque todas as células respondem aos estímulos (hormonais, nervosos) recebidos, mesmo que estes estímulos sejam captados por apenas algumas células do conjunto.*

Bibliografia

BENNET, V. The membrane skeleton of human erythrocytes and its implications for more complex cells. *Ann. Rev. Biochem., 54:*273, 1985.

BEYER, E.C. Gap junctions. *Int. Rev. Cytol., 137C:*1, 1993.

BOCK, G. and CLARK, S. (eds.) *Junctional Complexes of Epithelial cells. Ciba Symposium 125.* John Wiley, 1987.

BOCKAERT, J. Les récepteurs membrainaires. *La Recherche, 179*(juillet-août):892, 1986.

BRETSCHER, M.S. Endocytosis: relation to capping and cell locomotion. *Science, 224:*681, 1984.

BRETSCHER, M.S. The molecules of the cell membrane. *Sci. Am., 253:*100, 1985.

CAPALDI, R. A dynamic model of cell membranes. *Sci. Am., 230*(3):27, 1974.

CUATRECASAS, P. and GREAVES, M.F. (ed.) *Receptors and Recognition.* Series A, vol. 1 and 2. Chapman and Hall, 1976.

CUATRECASAS, P. Membrane receptors. *Ann. Rev. Biochem., 43:*169, 1974.

DINGLE, J.T. *Lysosomes in Biology and Pathology.* 5 vols. Elsevier/North-Holland, 1973-1978.

FINEAN, J.B.R., COLEMAN, R. and MICHELL, R.H. *Membranes and their Cellular Functions.* 3rd ed. Blackwell, 1984.

GARROD, D.R. Desmosomes, cell adhesion molecules and the adhesive properties of cells in tissues. *J. Cell Sci. Suppl. 4:*221-237, 1986.

GOLDSTEIN, J.L. *et al.* Receptor-mediated endocytosis. *Ann. Rev. Cell Biol., 1:*1, 1985.

HOLTZMAN, E. *Lysosomes.* Acad. Press, 1989.

LOEWENSTEIN, W.R. The cell-to-cell channel gap junctions. *Cell, 48:*725, 1987.

LUNA, E.J. and HITT, A.L. Cytoskeleton-plasma membrane interactions. *Science, 258:*955, 1992.

McCLOSKEY, M. and POO, M-M. Protein diffusion in cell membranes: some biological implications. *Int. Rev. Cytol., 87:*19, 1984.

MESQUITA-GUIMARÃES, J. and COIMBRA, A. Holocrine cell lysis in the rat preputial sebaceous gland. Evidence of autophagocytosis during cell involution. *Anat. Rec., 186:*49, 1976.

NEUFELD, E.F. Lysosomal storage diseases. *Ann. Rev. Biochem., 60:*257, 1991

OLIVEIRA-CASTRO, G.M. Junctional membrane permeability. Effects of divalent cations. *J. Membrane Biol., 5:*51, 1971.

PERACCHIA, C. Gap junctions struture and function. *Trends Biochem. Sci., 3:*26, 1978.

PETTY, H.R. *Molecular Biology of Membranes.* Plenum, 1993.

PUMPLIN, D.W. and BLOCH, R.J. The membrane skeleton. *Trends Cell Biol., 3:*113, 1993.

SAIER, M.H., Jr., and STILES, C.D. *Molecular Dynamics in Biological Membranes.* Springer-Verlag, 1975.

SCHWEIGER, H.G. (ed.) *International Cell Biology 1980-1981.* Springer-Verlag, 1981.

SINGER, S.J. The molecular organization of membranes. *Ann. Rev. Biochem., 43:*805, 1974.

SINGER, S.J. The structure and insertion of integral membrane protein. *Ann. Rev. Cell Biol., 6:*247, 1990.

STAEHELIN, L.A. and HULL, B.E. Junctions between living cells. *Sci. Amer., 238* (May):141, 1978.

STAEHELIN, L.A. Structure and function of intercellular junctions. *Int. Rev. Cytol., 39:*191, 1974.

UNWIN, B.M. and HENDERSON, R. The structure of proteins in biological membranes. *Sci. Am., 250*(2):78-94, 1984.

WEISSMANN, G. and CLAIBORNE, R. (ed.) *Cell Membranes.* HP Pub., New York, 1975.

6

Comunicações Celulares por Meio de Sinais Químicos

ROTEIRO

- *A comunicação entre as células é feita, principalmente, por meio de moléculas informacionais.*
- *A troca de sinais químicos entre as células é essencial para: formação dos tecidos, multiplicação celular, fagocitose, síntese de anticorpos, atração de leucócitos para defesa, coordenação do metabolismo e muitas outras atividades celulares.*
- *A molécula que constitui o sinal químico chama-se ligante.*
- *A molécula celular que se combina com o ligante e desencadeia uma resposta na célula chama-se receptor.*
- *Didaticamente, os sinais podem ser divididos em três categorias: hormônios, secreção parácrina e secreção de neurotransmissores; os sinais parácrinos podem influir sobre as células que os produziram (secreção autócrina).*
- *Nas junções comunicantes ou* gap junctions, *as células se intercomunicam diretamente. Há passagem livre de íons e moléculas pequenas através de canais entre células vizinhas.*
- *Moléculas sinalizadoras (ligantes) iguais muitas vezes promovem respostas diferentes, de acordo com as células-alvo.*
- *Um mesmo ligante pode atuar por caminhos diferentes: a adrenalina é um hormônio e também um neurotransmissor.*
- *As proteínas e os peptídeos hormonais, ao se combinarem com receptores da membrana, acionam a maquinaria citoplasmática que produz mensageiros intracelulares, como Ca^{2+} e AMP cíclico.*
- *Os hormônios esteróides e os da glândula tireóide penetram nas células e são captados por receptores intracelulares.*
- *O complexo constituído pelo receptor intracelular mais o hormônio prende-se ao DNA e influencia (geralmente estimulando) a transcrição gênica.*
- *Entre os mediadores que atuam próximo ao local de produção (secreção parácrina) estão os derivados do ácido araquidônico da membrana celular.*
- *Os principais mediadores derivados do ácido araquidônico, ou eicosanóides, são as prostaglandinas, os tromboxanos e os leucotrienos.*

Nos organismos multicelulares, a troca de informação por meio de moléculas, que são **sinais ou mensageiros químicos**, começa na vida embrionária e constitui, durante toda a vida, o principal meio de comunicação entre as células. Esses sinais são importantes para que os tecidos e órgãos se formem de modo ordenado e, após a estruturação do corpo, são necessários para coordenar o crescimento e o funcionamento das diferentes partes do organismo. Os mensageiros químicos influenciam o metabolismo, a multiplicação, a secreção, a fagocitose, a produção de anticorpos, a contração e muitas outras atividades celulares. Praticamente, todas as funções celulares e teciduais são reguladas por sinais químicos. Nesse capítulo será feita uma breve descrição do assunto, e serão apresentados alguns exemplos ilustrativos.

Esse sistema de comunicação atua através de moléculas sinalizadoras ou **ligantes**, que se prendem a locais específicos das **moléculas receptoras** ou **receptores** (Fig. 6.1). Para se caracterizar como receptor, uma molécula deve ser capaz de reconhecer especificamente outra molécula (ligante) e de desencadear uma resposta celular, quando unida com o respectivo ligante. Didaticamente, distinguem-se três tipos de comunicação, que serão mencionados a seguir (Fig. 6.2).

1) Pela secreção de moléculas denominadas **hormônios**, que são, geralmente, secretados pelas **glândulas endócrinas**. Os hormônios são lançados no espaço extracelular, penetram nos capilares sangüíneos e se distribuem por todo o corpo, indo atuar a distância, nas chamadas **células-alvo**. Célula-alvo é aquela que tem receptor para o hormônio.

2) Pela secreção de moléculas que atuam nas células vizinhas, sendo retidas no local de produção ou, então, inativadas logo após exercerem suas funções. Nesse modo de comunicação, chamado **comunicação parácrina**, os sinais químicos atuam nas proximidades do local onde foram secretados. O usual é que a molécula secretada por um tipo celular vá atuar sobre células de outro tipo. Porém, na secreção parácrina, algumas vezes, as moléculas sinalizadoras produzidas por um tipo celular agem sobre células do mesmo tipo que estão próximas, atingindo também a própria célula que originou o sinal químico. A secreção que atua sobre o mesmo tipo de célula se chama **secreção autócrina**.

3) Pela secreção de moléculas chamadas **neurotransmissores**. Essa secreção tem lugar nas **sinapses**, que são locais especializados onde as células nervosas (**neurônios**), através de seus numerosos prolongamentos, estabelecem contato umas com as outras. Os neurotransmissores são liberados, também, pelos prolongamentos das células nervosas que fazem conexão com células musculares (Fig. 6.3) ou com células secretoras. O neurotransmissor atravessa um espaço muito pequeno, de apenas alguns nanômetros, entre o terminal do prolongamento nervoso (**axônio**) e a outra célula nervosa, a célula muscular ou a célula secretora, conforme o caso.

Além dos processos mencionados, que envolvem ligantes e receptores, algumas células se comunicam diretamente por meio de moléculas que passam por **canais** existentes entre células contíguas. Esses canais são constituídos por moléculas protéicas das membranas de duas células, em regiões chamadas **junções comunicantes** ou ***gap junctions***, estudadas no Cap. 5.

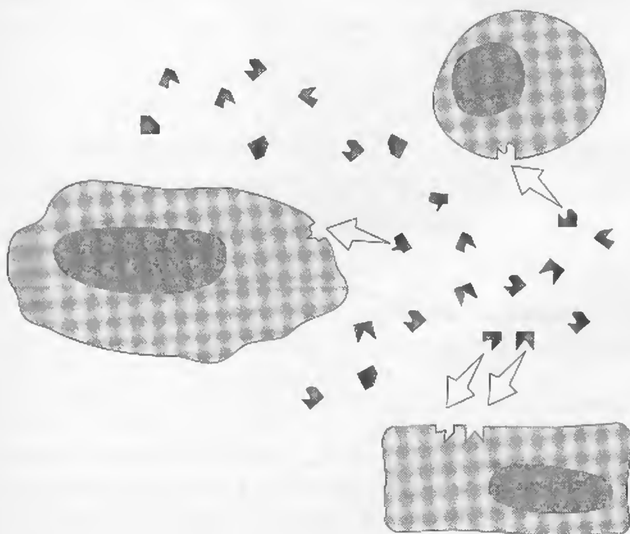


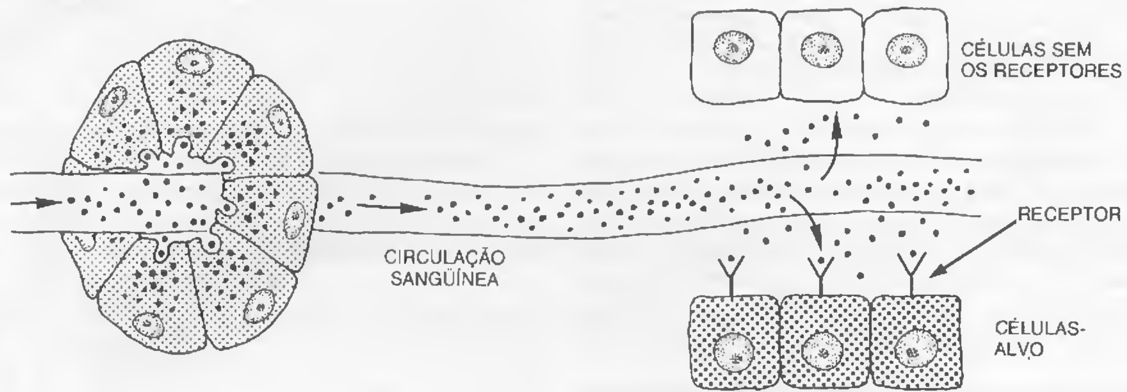
Fig. 6.1 Desenho esquemático mostrando que existe grande variedade de moléculas com potencial informacional no meio extracelular. Os receptores reconhecem, selecionam e interagem especificamente com certas moléculas, dentre as inúmeras que entram em contato com as células. Observe que as três células representadas no desenho têm receptores diferentes e, por isso, não reagem aos mesmos sinais.

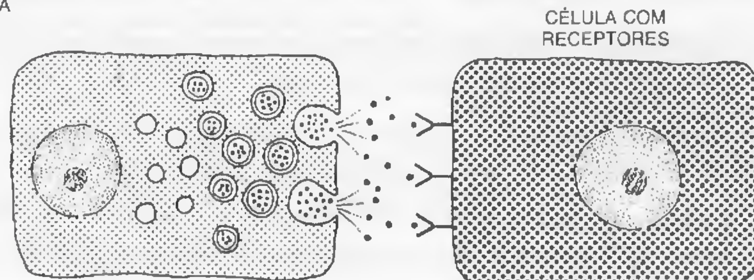
A resposta a um sinal químico pode variar conforme as características do receptor

A maioria das células do corpo dos animais contém um conjunto selecionado de receptores para os numerosos sinais químicos que ativam, ou inibem, as atividades celulares. As respostas das células diante dos diversos sinais dependem, basicamente, do elenco de receptores que cada célula recebeu durante sua diferenciação embrionária. A resposta da célula-alvo pode depender também de diferenças na estrutura molecular do receptor. Por exemplo, os receptores para acetil-colina são diferentes no músculo esquelético e no músculo cardíaco, e a acetil-colina estimula a contração dos músculos esqueléticos, mas diminui o ritmo e a força das contrações do músculo do coração (miocárdio). Porém, na maioria das células, os receptores para determinado sinal são iguais, mas as respostas podem ser diferentes, indicando que a resposta, nesses casos, depende da maquinaria molecular intracelular à qual os receptores estão ligados.

Os hormônios geralmente são produzidos pelas glândulas endócrinas

As células produtoras de hormônios geralmente constituem órgãos especializados, as **glândulas endócrinas**. A comunicação hormonal é um processo relativamente lento, porque os hormônios levam algum tempo para se distribuírem pelo corpo, carregados pela corrente sangüínea (Fig. 6.2). Depois de deixarem os capilares, por difusão, os hormônios são captados pelas células que possuem receptores específicos. A especificidade dos hormônios depende não somente de sua natureza química, mas também da existência de receptores apropriados nas células-alvo.





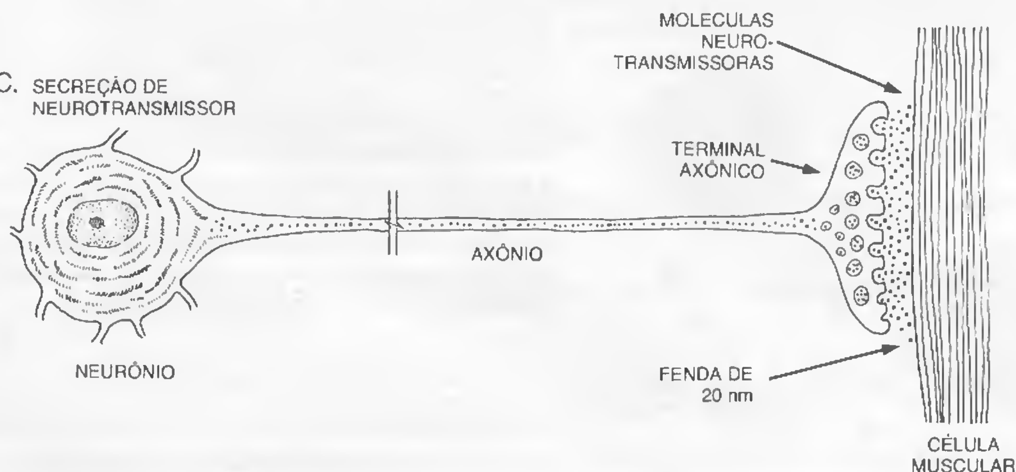


Fig. 6.2 Desenhos esquemáticos mostrando os três tipos principais de comunicação entre as células por meio de moléculas específicas (sinais químicos). **A**. Comunicação pela secreção de hormônio, que é transportado pelo sangue e vai influir, a distância, sobre as células que possuem receptores com afinidade para o hormônio (células-alvo). **B**. Comunicação do tipo parácrino, que se caracteriza, principalmente, pelo fato de que as moléculas informacionais, secretadas no meio extracelular, atuam sobre células próximas. As moléculas secretadas atravessam apenas alguns milímetros, no máximo alguns centímetros, até atingirem as células-alvo (células com receptores para a molécula sinalizadora). **C**. Comunicação por neurotransmissores. Nesse tipo de comunicação, a molécula neurotransmissora é liberada a uma distância de apenas 20 nm da célula que recebe a informação. Os receptores da célula captadora se localizam exclusivamente na área da membrana em frente ao terminal do axônio, que é a parte final, dilatada, deste prolongamento neuronal.

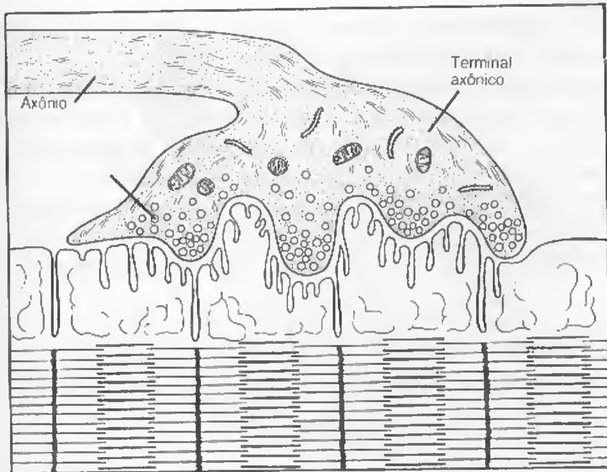


Fig. 6.3 Comunicação intercelular por neurotransmissor. O desenho mostra um terminal axônico (em cima) sobre uma fibra muscular estriada (embaixo). O axônio exibe, em corte, muitos microtúbulos e filamentos intermediários. O terminal axônico tem mitocôndrias, cisternas do retículo endoplasmático rugoso e numerosas vesículas, chamadas vesículas sinápticas, contendo o neurotransmissor acetil-colina. A parte pregueada da membrana da fibra muscular contém grande quantidade de receptores para acetilcolina (não mostrados no desenho). Observe que o espaço entre a membrana plasmática do terminal axônico e a fibra muscular é muito pequeno. Esse espaço, chamado fenda sináptica, mede apenas 20 nm.

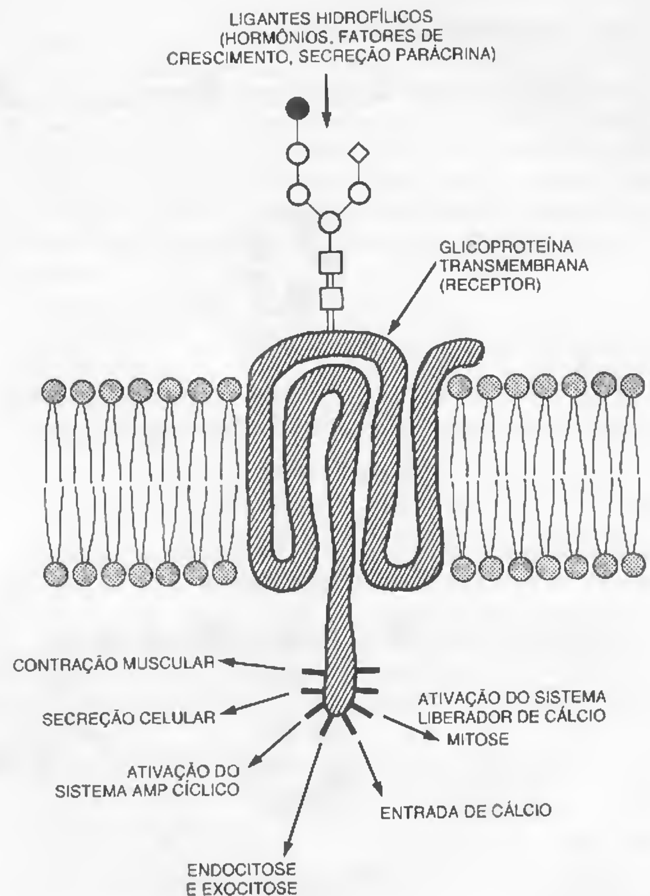


Fig. 6.4 Desenho esquemático mostrando como moléculas hidrofílicas afetam as funções celulares agindo sobre receptores (glicoproteínas) da membrana plasmática. As moléculas mensageiras (ligantes) hidrofílicas geralmente são de natureza protéica. Os fatores (ligantes) de natureza lipídica, como os hormônios esteróides, agem sobre receptores intracelulares. Cerca de 80% dos sinais químicos, aos quais as células estão sujeitas normalmente, são hidrofílicos. Observe, na parte inferior do desenho, a variedade de respostas, que depende das características da célula-alvo.

Cada tipo de célula endócrina geralmente secreta um hormônio, e as células que possuem receptores para esse hormônio reagirão de uma maneira correspondente à natureza da célula-alvo (Fig. 6.4). Por exemplo, a resposta pode ser a liberação de secreção, ou a inibição da atividade secretória, conforme o hormônio e conforme o tipo de célula-alvo. Como os hormônios se diluem muito, no sangue e no fluido extracelular, é indispensável que os receptores os fixem com grande afinidade.

As células neuroendócrinas do hipotálamo são importantes para a coordenação do sistema endócrino

Nos vertebrados, existe uma ligação dos sistemas nervoso e endócrino, numa região do cérebro chamada **hipotálamo**. O hipotálamo se comunica com a **hipófise**, através do **pedículo hipofisário**. Esse pedículo é formado por vasos sangüíneos e numerosas extensões (axônios) de células nervosas (neurônios) localizadas no hipotálamo. São células nervosas que secretam hormônios e, por isso, chamadas de **células neuroendócrinas**. Assim, no hipotálamo e na hipófise existe uma associação funcional entre o sistema nervoso e o endócrino, associação esta que influencia numerosas funções do organismo. Células neuroendócrinas do hipotálamo respondem a estímulos recebidos de outras células nervosas, secretando hormônios que são liberados no pedículo hipofisário, penetram nos numerosos capilares sangüíneos aí existentes e vão estimular, ou inibir, a atividade secretora das células da parte anterior da hipófise. Outros axônios, também originados de células neurossecretoras do hipotálamo, são mais longos e vão constituir a **neuro-hipófise**. Esses axônios conduzem e liberam, na neuro-hipófise, os hormônios **antidiurético** (ADH) e **oxitocina**. O hormônio antidiurético diminui a eliminação de água pelos rins e a oxitocina estimula a contração da musculatura lisa do útero no momento do parto.

Algumas respostas a hormônios são rápidas e de duração breve

Por exemplo, o aumento da concentração de glicose no sangue estimula as células A do **pâncreas endócrino** a secretarem **insulina**, uma proteína muito solúvel no plasma sangüíneo. Em poucos minutos, a insulina se distribui pelo corpo, estimulando a captação de glicose, principalmente pelas células adiposas e pelas células musculares, fazendo cair para níveis normais a con-

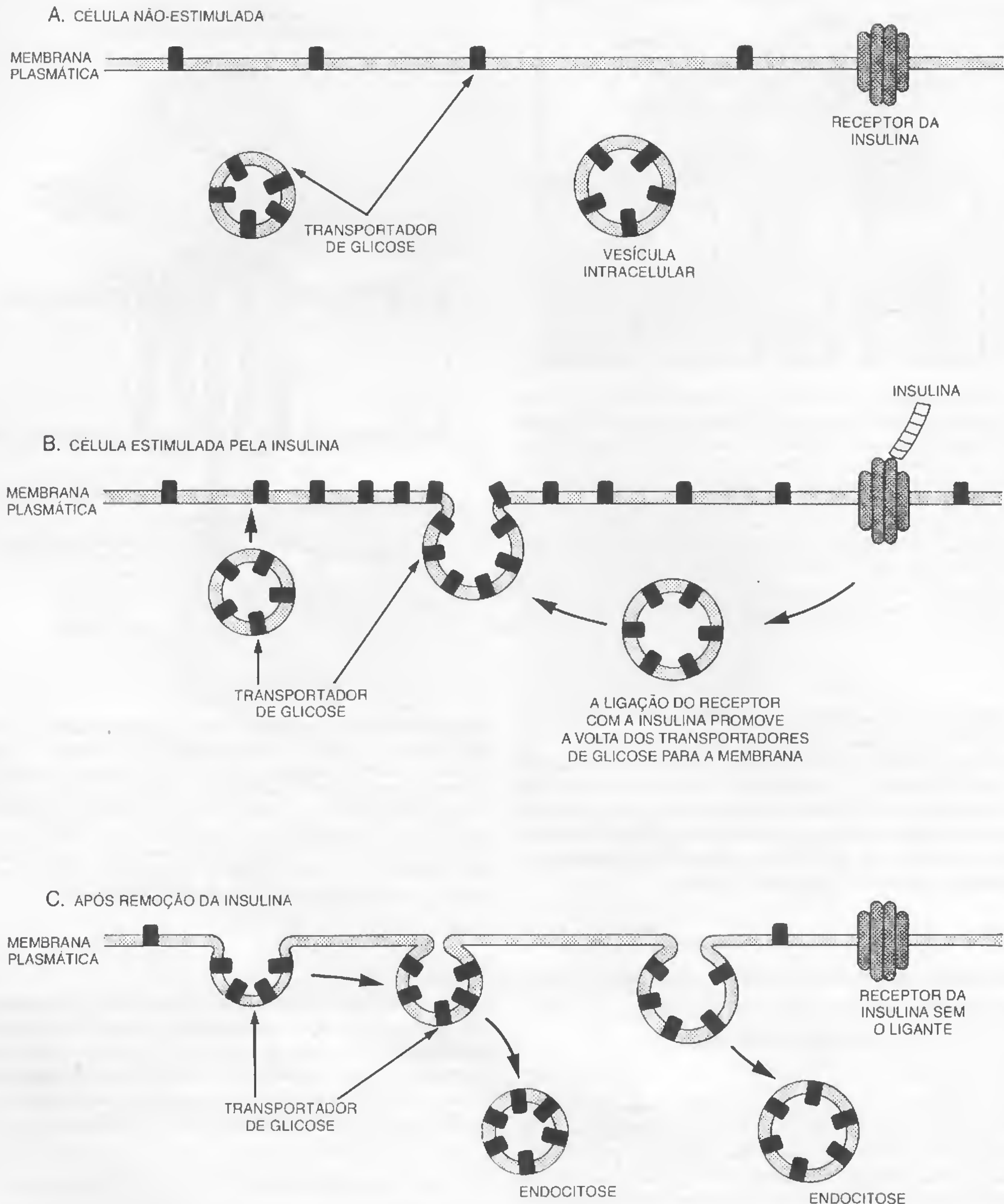


Fig. 6.5 Desenho esquemático mostrando alguns aspectos do estímulo produzido nas células-alvo pela insulina, principal hormônio regulador do teor de glicose no sangue. A insulina estimula a penetração da glicose nas células, onde ela é depositada sob a forma de glicogênio, importante reserva energética. Conseqüentemente, a insulina faz baixar a concentração de glicose no sangue. **A.** Célula não estimulada, aparecendo o receptor para insulina inserido na membrana plasmática e diversas vesículas intracitoplasmáticas contendo uma reserva de moléculas transportadoras de glicose. A quantidade dessas moléculas na membrana plasmática é relativamente pequena, o que diminui a capacidade de transporte de glicose para o interior da célula. **B.** A combinação da insulina com seu receptor (à direita do desenho) estimula a transferência das vesículas contendo o transportador de glicose para a membrana plasmática, aumentando a capacidade de captação de glicose devido ao aumento do número de transportadores na membrana plasmática. **C.** A remoção da insulina estimula a endocitose dos transportadores de glicose, que voltam à sua localização intracelular, onde permanecem como reserva para uso posterior, quando o receptor de insulina receber novamente o estímulo hormonal.

centração sangüínea de glicose. A resposta, nesse caso, é rápida porque, nas células A do pâncreas endócrino, existe constantemente insulina pronta para ser liberada, e existe uma reserva de receptores para insulina e de moléculas transportadoras de glicose, na membrana plasmática das células musculares e adiposas (Fig. 6.5). A combinação da insulina com os respectivos receptores ativa a penetração de glicose no citoplasma, onde ela será armazenada nas moléculas de glicogênio, que é um polímero da glicose e constitui uma reserva nutritiva para as células animais.

Outra diferença entre os hormônios hidrossolúveis e os lipossolúveis diz respeito ao tempo de permanência no sangue e nos fluidos teciduais. Geralmente, os hormônios hidrossolúveis são eliminados do sangue poucos minutos após serem secretados. Ao contrário, os hormônios esteróides persistem no plasma sangüíneo durante horas, e os hormônios da tireóide por tempo ainda mais longo, muitas vezes durante alguns dias. Isto significa que os hormônios lipossolúveis tendem a mediar respostas mais prolongadas.

Hormônios lipossolúveis têm ação mais prolongada

Embora a grande maioria dos hormônios seja hidrossolúvel e atue sobre receptores situados na membrana plasmática, alguns são lipossolúveis, atravessam a membrana celular com facilidade e se fixam a receptores localizados no citoplasma e no núcleo das células-alvo. São exemplos os hormônios **esteróides** e os hormônios da glândula tireóide, **tiroxina** ou **tetraiodotironina** (T4) e **triiodotironina** (T3). Os hormônios esteróides e os da tireóide são transportados no plasma sangüíneo ligados a proteínas transportadoras, mas, ao atravessarem a membrana plasmática, as proteínas transportadoras são separadas dos hormônios, e somente estes atravessam a membrana celular. O hormônio sexual masculino (**testosterona**) e os femininos (**estrógenos** e **progesterona**) são esteróides.

Mecanismo de ação dos hormônios que atuam por intermédio de receptores da membrana

Todos os hormônios hidrossolúveis são captados por receptores localizados na membrana plasmática das células-alvo (Fig. 6.4). Alguns, como os receptores para insulina, são denominados **catalíticos**, porque, quando ativados, funcionam como enzimas, geralmente cinases protéicas que fosforilam a hidroxila da tirosina de proteínas citoplasmáticas específicas.

Porém, a maioria das moléculas sinalizadoras hidrossolúveis age sobre receptores que atuam por intermédio de uma cadeia de moléculas, que vai modificar os níveis intracelulares de AMP cíclico (cAMP) ou Ca^{2+}. AMP cíclico e Ca^{2+} são denominados **mediadores** ou **mensageiros intracelulares** (Fig. 6.6).

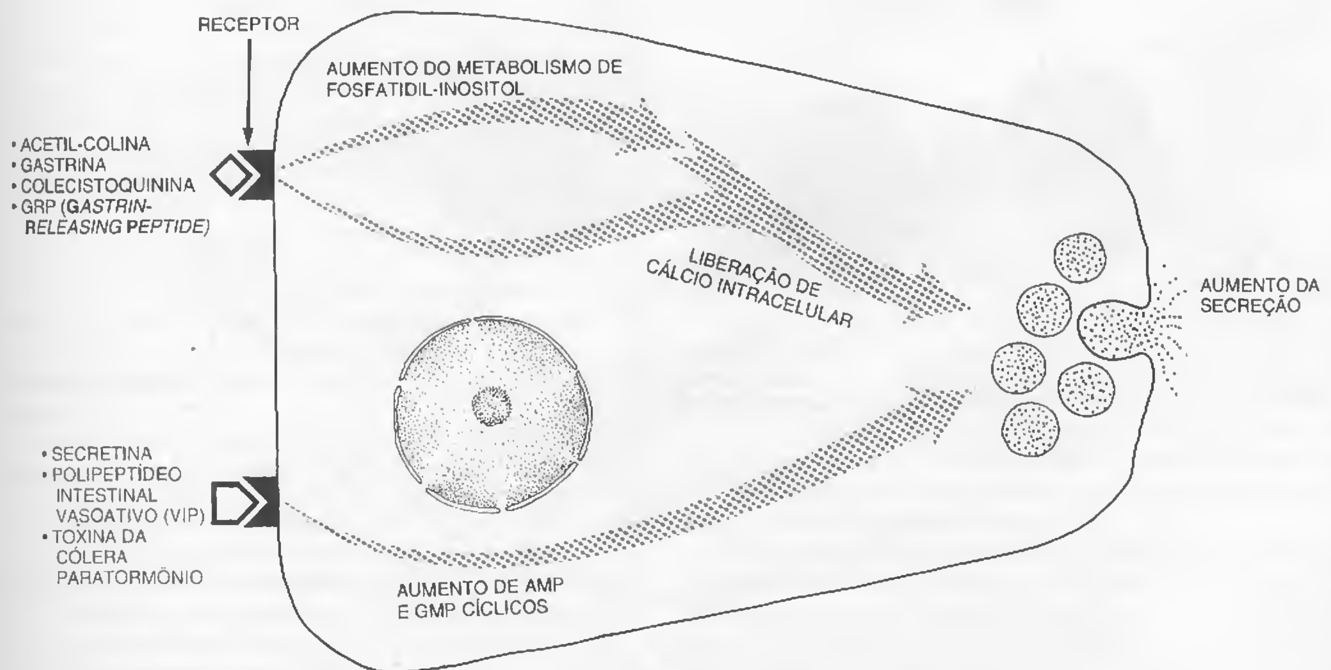


Fig. 6.6 Desenho esquemático ilustrando a formação de mensageiros intracelulares, usando como exemplo o estímulo secretório da célula exócrina (acinar) do pâncreas. A parte **superior** da figura mostra os sinais químicos que agem pela liberação de Ca^{2+}. A parte **inferior** do desenho mostra o aumento da concentração dos nucleotídeos cAMP e cGMP. Todos os sinais químicos indicados à esquerda (apenas alguns exemplos) aumentam a secreção pela célula acinar do pâncreas, embora ativem mecanismos intracelulares diferentes. (Baseado em Gardner, J.D. and Jensen, R.T. Gastrointestinal peptides. The basis of action at cellular level. *Recent. Prog. Horm. Res.*, 39:211, 1983.)

Por exemplo, quando as células musculares ou hepáticas são expostas ao hormônio adrenalina, há um aumento no teor intracelular de cAMP que ativa a enzima fosforilase glicogênica. Essa enzima promove a hidrólise do glicogênio armazenado nas células, formando-se glicose. Para que o cAMP funcione adequadamente como um mediador intracelular, é preciso que ele seja sintetizado e degradado rapidamente, já que, do contrário, sua atuação permaneceria por tempo excessivo. AMP cíclico é produzido a partir de ATP pela enzima adenilato ciclase, que se encontra presa à membrana celular. A destruição do cAMP deve-se às cAMP fosfodiesterases que hidrolisam o cAMP produzindo adenosina-5'-monofosfato (5'-AMP).

A mesma molécula sinalizadora pode aumentar ou diminuir o nível intracelular de cAMP, conforme o tipo de receptor presente na célula-alvo. Por exemplo, os receptores ß-adrenérgicos, ao receberem moléculas de adrenalina, aumentam o teor intracelular de cAMP, enquanto os receptores α_2-adrenérgicos diminuem o teor de cAMP ao captarem adrenalina.

Quando vários ligantes atuam sobre uma célula cuja membrana possui receptores específicos para todos eles, a resposta é menor do que seria de esperar da soma dos estímulos recebidos. A explicação reside no fato de que a maquinaria produtora de mensageiros intracelulares não é capaz de atender a todos os receptores simultaneamente. Os receptores compartilham esta maquinaria, sendo deslocados, na bicamada lipídica, para atuar sobre os componentes intracelulares produtores de mensageiros. Nessa movimentação, os receptores são impulsionados pelos filamentos do citoesqueleto.

A concentração de íons cálcio na matriz citoplasmática é extremamente baixa, enquanto a concentração desse íon é alta no meio extracelular e nos compartimentos intracelulares que armazenam Ca^{2+}. Quando um sinal químico se liga a certos receptores, forma-se trifosfato de inositol que promove a abertura dos canais de Ca^{2+} do retículo endoplasmático liso (Fig. 6.7), aumentando a concentração deste íon na matriz citoplasmática e ativando os mecanismos intracelulares sensíveis ao cálcio. Todas as células possuem bombas em suas membranas que, consumindo energia de ATP, movimentam para fora da célula o excesso de Ca^{2+}. Além disso, as células possuem porções do retículo endoplasmático liso especializadas em armazenar íons cálcio (Fig. 6.7). As membranas desse retículo também possuem bombas de cálcio, e, nas cisternas do retículo, existe uma proteína especializada na captação e liberação de cálcio, denominada **calseqüestrina**. As mitocôndrias também podem armazenar cálcio graças à atividade transportadora da membrana interna dessas organelas. Mas, funcionalmente, o retículo liso é o compartimento seqüestrador de cálcio mais importante.

Foi demonstrado que o Ca^{2+} funciona como um mensageiro intracelular em grande variedade de respostas, como a secreção celular e a proliferação mitótica. Foram descritas duas vias para aumentar os níveis de cálcio em resposta a um sinal químico.

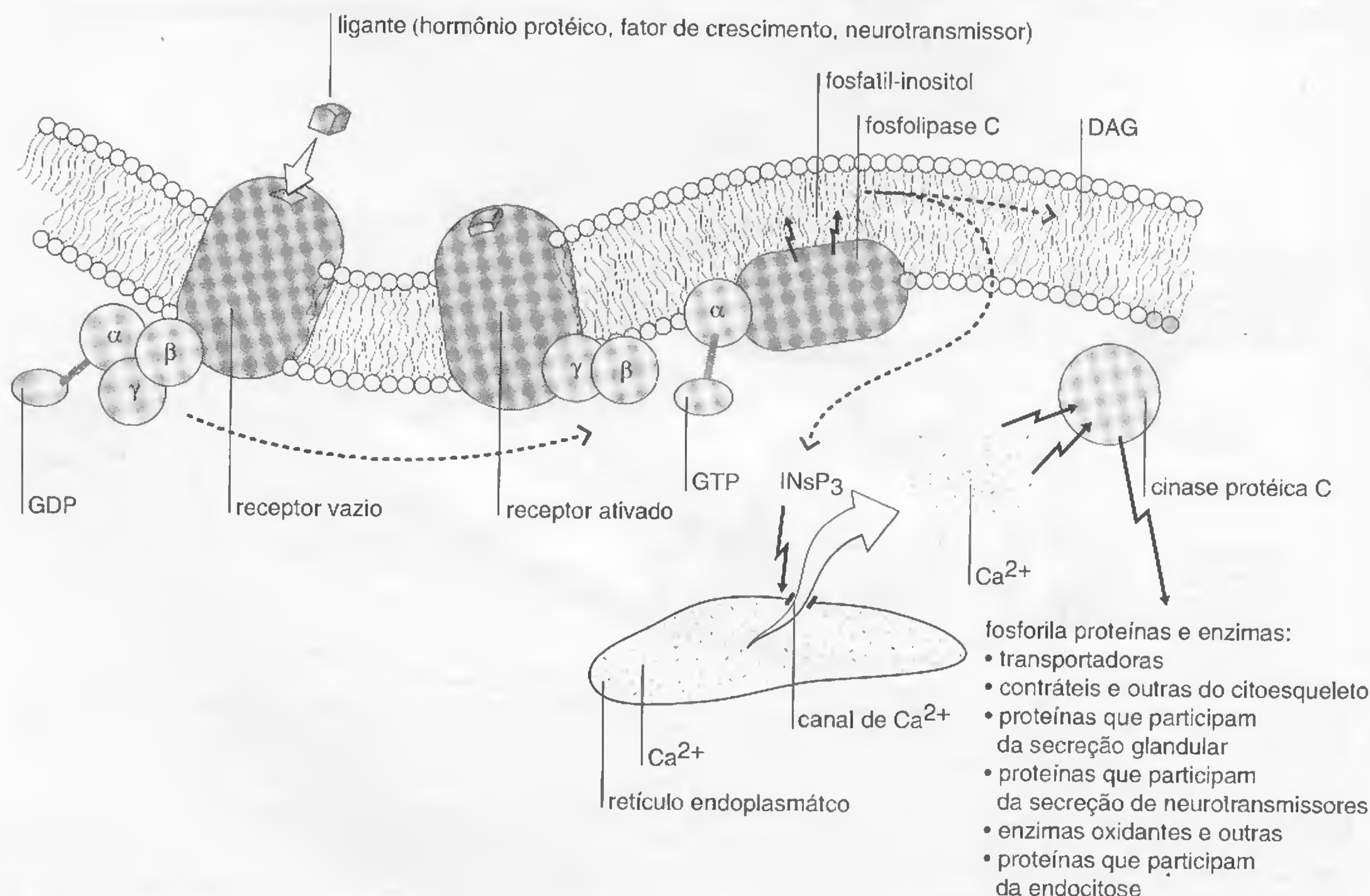


Fig. 6.7 Desenho mostrando a participação de uma proteína G na ativação intracelular através do cálcio e de DAG (diacilglicerol). Íons Ca^{2+} e DAG atuam sobre a cinase protéica C, ativando-a. A ativação dessa enzima vai influir sobre diversas atividades celulares.

Principalmente nas células nervosas, o sinal químico abre um canal para o cálcio, situado na membrana plasmática, que normalmente está fechado. Como a concentração de Ca^{2+} é mais alta no meio extracelular, a abertura desses canais da membrana plasmática promove a penetração de Ca^{2+} no citosol. Nas demais células, o sinal, ao se ligar ao receptor da membrana, gera trifosfato de inositol, e este abre os canais para cálcio existentes na membrana do retículo endoplasmático liso, promovendo saída brusca do cálcio para o citosol. Tanto o AMP cíclico como o Ca^{2+}, que são os dois principais mensageiros intracelulares, atuam como pela adição de grupamentos fosfato do ATP a certas cinases protéicas, modificando a conformação espacial dessas enzimas e, assim, alterando a atividade delas.

Receptores catalíticos são glicoproteínas transmembrana com atividade enzimática

A maioria dos receptores da membrana plasmática age regulando a atividade de várias proteínas, até produzirem um mensageiro intracelular, geralmente cAMP ou Ca^{2+} (Figs. 6.6 e 6.7). Alguns receptores, porém, atuam mais diretamente e são chamados **receptores catalíticos**. Os receptores catalíticos são glicoproteínas transmembrana. Os mais bem estudados são cinases protéicas específicas para a tirosina. Esses receptores têm a parte que adere ao sinal químico (hormônio, fator de crescimento) exposta na superfície da membrana, e a parte que se localiza no citoplasma tem ação enzimática, ou está diretamente ligada a uma enzima. Quando a extremidade externa desses receptores recebe o sinal químico, a parte citoplasmática, que é uma cinase protéica, torna-se ativa e transfere o grupamento fosfato terminal do ATP para o grupamento hidroxila da tirosina de certas proteínas. Essa família inclui os receptores para insulina e para diversos **fatores de crescimento**, como o fator de crescimento derivado das plaquetas (**PDGF**, *platelet-derived growth factor*) e o fator de crescimento da epiderme (**EGF**, *epidermal growth factor*). Devido à importância médica da insulina, o receptor para esse hormônio tem sido muito estudado. Foi descoberto um receptor mutante para insulina no qual apenas um aminoácido foi substituído. Esse receptor mutante não reage diante da insulina. Por isso, as pessoas que possuem esses receptores defeituosos são diabéticas, independentemente do teor de insulina produzida pelo pâncreas.

Alguns receptores catalíticos (cinases da tirosina) atuam inicialmente sobre uma proteína ligada à superfície citoplasmática da membrana celular, denominada Ras (de ***rat sarcoma***) porque foi descoberta em sarcomas (um tipo de câncer) de ratos. A proteína Ras participa da transmissão recebida por um receptor que é uma cinase da tirosina (receptor catalítico) levando a informação, através de vários estágios, até o interior do núcleo celular para estimular a diferenciação e a multiplicação da célula. A proteína Ras, bem como outras que ligam receptores a efetores intracelulares, funciona como um interruptor que é ligado por GTP e desligado quando esse nucleotídeo perde um radical fosfato e se transforma em GDP. Ras está ativada quando combinada com GTP, e inativa quando ligada a GDP.

A própria Ras hidrolisa GTP, que passa a GDP, desligando o sistema. Todavia, a atividade de Ras para retirar um grupo fosfato de GTP transformando-o em GDP é muito lenta e, como a concentração citosólica de GTP é maior do que a de GDP, Ras permaneceria ativa se a célula não tivesse mecanismos para desativá-la. As proteínas intracelulares que regulam a atividade da proteína Ras pertencem a dois grupos. As proteínas ativadoras das GTPases, denominadas **GAPs** (acrônimo de **GTP-*activating proteins***), aceleram a hidrólise do GTP ligado à Ras, transformando-o em GDP e inativando a proteína Ras. As GAPs são, portanto, reguladores negativos, cuja atividade é contrabalançada pelos reguladores positivos, as **GNRPs** (***guanine nucleotide releasing proteins***). As GNPRs promovem a troca do nucleotídeo ligado, estimulando a perda de GDP e a entrada de GTP oriundo do citosol, o que ativa a proteína Ras. Essa troca é facilitada porque o citosol contém maior concentração de GTP do que de GDP.

A proteína Ras permanece ativada por um tempo muito curto e, para exercer os efeitos iniciados pela ligação do sinal extracelular com o receptor, entra em ação uma seqüência de modificações, em mais de um sistema, que leva o sinal para o núcleo da célula. Diversas cinases protéicas participam desses sistemas, porém o grupo mais importante é uma família de proteínas conhecida como cinases mitogênicas.

Além de Ras existem outras proteínas, ligadas a receptores da membrana, que transmitem sinais para o núcleo, estimulando a diferenciação e a multiplicação das células. A proteína Ras foi escolhida como exemplo pelo fato de que, em 30% dos cânceres, foi encontrada uma proteína Ras anormal, que se mantém sempre ativa. Nos tecidos normais, as células se multiplicam somente em certos momentos, mas, no câncer, a multiplicação é desordenada, pois os mecanismos que levam à proliferação celular estão ativados de modo permanente. Em diversos tipos de câncer (tumor maligno), foram encontradas outras proteínas anormais estimuladoras de mitose, além da proteína Ras anormal.

Receptores que atuam sobre a proteína G aumentam a concentração de Ca^{2+} ou de cAMP

Os receptores com atividade de cinase protéica, ou receptores catalíticos, já estudados, são muito menos diversificados e menos numerosos. Os mais freqüentes para a recepção de sinais hidrofílicos na superfície celular são os receptores ligados à proteína da membrana denominada **proteína G**, assim chamada porque pode conter GDP, ou GTP. Essa proteína é um interruptor que é ligado por GTP e desligado quando esse nucleotídeo é desfosforilado e se transforma em GDP.

Os receptores ligados às proteínas G são moléculas protéicas complexas, com sete passagens pela membrana. A captação de um sinal químico pelo segmento extracelular ativa o receptor que atua sobre a proteína G e esta, através de uma cadeia de reações, gera cAMP ou Ca^{2+} que vão ativar cinases protéicas. As cinases, ativadas por esta via, vão adicionar grupamentos fosfato à serina ou à treonina de certas proteínas, que são os alvos do sinal captado pelo receptor. Trata-se de uma via muito importante para o funcionamento das células eucariontes, e já foram identificadas numerosas cinases protéicas, influenciadas pelos receptores ligados às proteínas G.

As moléculas das proteínas G são formadas por três polipeptídeos chamados cadeias α, β e γ. As três cadeias estão localizadas na face citoplasmática da membrana celular. A cadeia α tem a capacidade de se ligar a GDP ou GTP e é a parte da molécula da proteína G que ativa a próxima molécula na cadeia efetora. Quando está ligada a GDP e, portanto, o interruptor está desligado, a cadeia α tem grande afinidade pelas cadeias β e γ. Assim, a molécula da proteína G permanece inativa e com suas três cadeias fortemente presas. A ligação de um sinal químico ativa a parte citoplasmática do receptor, que, então, adiciona um grupo fosfato ao GDP da cadeia α tornando-a ativa e liberando-a das outras duas cadeias da molécula da proteína G. Enquanto o receptor estiver ocupado por um sinal, a cadeia α permanece ativa e separada das outras duas cadeias (Fig. 6.7). Quando o receptor e o sinal químico se separam, a própria cadeia α hidrolisa o GTP, transformando-o em GDT. Em conseqüência, as três cadeias da proteína G se prendem novamente, e o interruptor é desligado.

As proteínas G são de ocorrência muito geral e já foram detectadas em muitos vertebrados, invertebrados e em células de vegetais. Essa distribuição tão ampla indica que essas proteínas surgiram muito cedo durante a evolução dos seres multicelulares. Um passo demorado, na evolução das células, foi o aparecimento dos seres multicelulares, provavelmente pela dificuldade no estabelecimento de mecanismos de comunicação entre as células, essenciais para coordenar o funcionamento de cada célula em benefício do conjunto. Nesses conjuntos, cada célula só pode realizar uma pequena parte do programa contido no seu DNA, daí a importância dos mecanismos que restringem o que cada célula pode fazer sem prejudicar o conjunto.

As proteínas G atuam através de duas vias: uma dependente de cAMP e a outra dependente de íons Ca^{2+} liberados do REL pela ação de trifosfato de inositol

Embora os mensageiros intracelulares produzidos pelas proteínas G formem sempre cinases protéicas que vão fosforilar aminoácidos, isto é conseguido por meio de duas vias. Uma via gera AMP cíclico, cAMP, produzido de ATP pela enzima adenilato ciclase. Como o cAMP é uma molécula pequena, difunde-se rapidamente pelo citosol, indo ativar diversas cinases protéicas. A outra via consiste na ruptura da molécula de um fosfolipídio da membrana, o fosfatidil-inositol, reação que é catalisada pela fosfolipase C, produzindo trifosfato de inositol ($InsP_3$), que também é uma molécula pequena e solúvel, formada pelo inositol mais três grupamentos fosfato. Na reação, também se forma diacilglicerol, que fica preso à bicamada lipídica da membrana, podendo ser reaproveitado para formar lipídios da membrana. O trifosfato de inositol se difunde pelo citosol e vai abrir os canais de Ca^{2+} do retículo endoplasmático liso, principal depósito citoplasmático de Ca^{2+}, liberando esse íon para o citosol.

Para o bom funcionamento do sistema, é importante que os mensageiros sejam degradados após realizarem suas funções. O cAMP é rapidamente destruído pelas cAMP fosfodiesterases. O trifosfato de inositol, através de algumas reações, é transformado de volta ao estado de fosfatidil-inositol. Os íons Ca^{2+} são eliminados do citosol por meio de canais seletivos (bombas de cálcio), localizados nas membranas do retículo endoplasmático liso e na membrana celular, que transferem Ca^{2+} para as cisternas do retículo ou para o meio extracelular, respectivamente.

Modificações adaptativas nas células-alvo

Uma célula exposta ao mesmo estímulo (sinal químico), por um longo período de tempo, passa a responder ao estímulo com intensidade menor. Por meio desse processo, chamado de **adaptação ou dessensibilização**, a célula ajusta de modo reversível sua sensibilidade ao nível do estímulo. No caso dos sinais químicos, a dessensibilização possibilita que as células, dentro de certos limites, se ajustem a modificações na concentração das moléculas sinalizadoras.

Essa adaptação se deve a vários mecanismos. Pode haver diminuição da quantidade de receptores; ou esses receptores podem modificar-se, diminuindo sua afinidade para o ligante. Outras vezes, ocorrem modificações nas proteínas intermediárias entre os receptores e os mensageiros intracelulares cAMP ou Ca^{2+}.

Muitas vezes, a dessensibilização é conseqüência da endocitose

Quando os hormônios protéicos e os fatores de crescimento se ligam a receptores da membrana da célula-alvo, freqüentemente provocam a endocitose. Muitas vesículas de endocitose, mas não todas, se fundem com os endosomas, onde o pH ácido separa os ligantes dos receptores; algumas vezes, os receptores são digeridos pelas enzimas hidrolíticas dos lisosomas. Esse processo limita a ação do hormônio e regula a concentração de receptores na superfície celular. Embora a formação de vesículas endocíticas ocorra continuamente, mesmo na ausência de ligante, existe uma aceleração no processo quando o ligante se une ao receptor. Experimentos feitos com fibroblastos mostraram que a presença do fator de crescimento da epiderme, que se fixa a receptores fibroblásticos, acelera de modo muito acentuado a degradação desses receptores. Portanto, concentrações altas do ligante diminuem o número de receptores e, conseqüentemente, diminuem também a sensibilidade da célula ao sinal químico. Por meio deste tipo de **regulação dos receptores para menos** *(receptors-down regulation)*, a célula ajusta sua sensibilidade à concentração da molécula sinalizadora.

A maioria dos receptores endocitados, porém, não é digerida pelos lisosomas, mas sim reciclada de volta para a membrana plasmática. Nesses casos, quando aumenta a concentração do ligante, aumenta a quantidade de receptores localizados em vesículas endocitóticas situadas no citoplasma e, portanto, inacessíveis ao sinal que chega à superfície celular. Há uma queda na sensibilidade da célula devido ao **seqüestro dos receptores**.

Hormônios lipossolúveis atuam sobre receptores intracelulares

Muitos aspectos do desenvolvimento intra-uterino e pós-natal, assim como das funções de muitos órgãos, são regulados por diversos **hormônios esteróides**. Todos esses hormônios são sintetizados a partir do colesterol, e são moléculas pequenas, com cerca de 300 dáltons, lipossolúveis, capazes de atravessar facilmente as membranas celulares por difusão passiva. Esses hor-

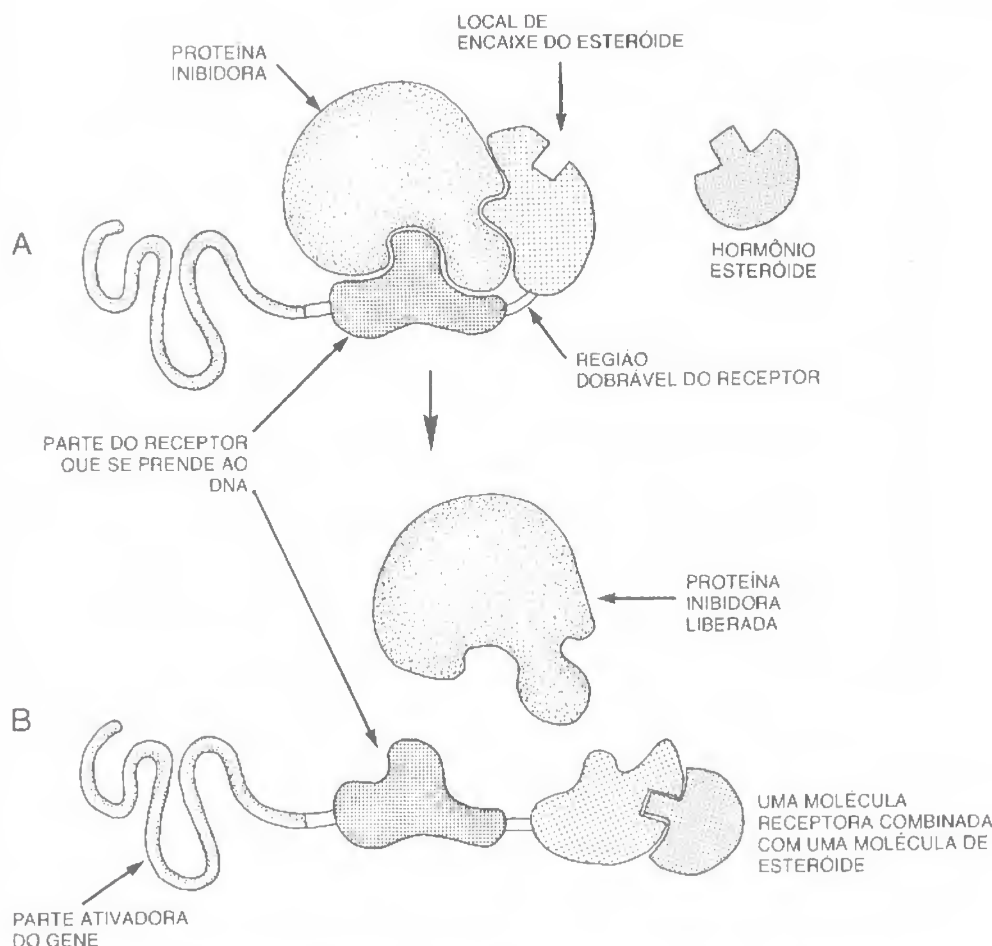


Fig. 6.8 Desenho esquemático mostrando o modelo proposto para a configuração espacial do receptor para hormônio esteróide e as modificações sofridas pelo receptor ao se combinar com o respectivo hormônio. O desenho **A** mostra um receptor não combinado com o esteróide. Esse receptor é inativo porque o segmento de sua molécula que tem afinidade pelo DNA está coberto por uma proteína inibidora. O desenho **B** (embaixo) mostra que o hormônio esteróide modifica a forma do receptor, elimina a molécula da proteína inibidora e expõe a região do receptor que tem afinidade para o DNA. Assim, o complexo do esteróide com seu receptor combina-se com certas seqüências nucleotídicas do DNA nuclear e vai influir na atividade gênica. Geralmente há um aumento na síntese de RNA mensageiro.

mônios (por exemplo, estrógenos, testosterona) são transportados pelo plasma sangüíneo, sob a forma de complexos com **proteínas anfipáticas**, isto é, que apresentam moléculas com regiões hidrofóbicas, onde se ligam os hormônios esteróides, e regiões hidrofílicas, responsáveis pela solubilidade do complexo no plasma sangüíneo e no líquido que banha as células. Antes de sua penetração nas células, esses hormônios se separam da proteína transportadora, que permanece no líquido extracelular.

Uma vez penetrando nas células-alvo, os hormônios esteróides se ligam a receptores específicos e causam modificação na conformação espacial desses receptores (Fig. 6.8). Essa modificação, que se chama **ativação do receptor**, aumenta a afinidade do receptor para o DNA e a possibilidade de união do receptor protéico ativado a determinados segmentos de genes nucleares específicos, regulando a transcrição desses genes. Os hormônios da tireóide (tiroxina ou T4 e triiodotironina ou T3) são aminoácidos hidrofóbicos modificados, mas atuam de modo semelhante aos hormônios esteróides.

O receptor ativado por hormônios esteróides prende-se a seqüências específicas de DNA e influencia a transcrição gênica

Alguns tipos de receptores para hormônios esteróides localizam-se principalmente no citoplasma, e outros são mais abundantes no núcleo. Nos dois casos, os receptores (proteínas) são inativos, e só adquirem atividade quando se ligam de modo seletivo ao respectivo hormônio (Fig. 6.8). A união dos complexos receptor + hormônio a locais específicos do DNA geralmente ativa os genes próximos, porém algumas vezes o efeito é inibidor, quer dizer, a formação de mRNA por esses genes em geral é estimulada, porém algumas vezes é inibida. O segmento de DNA que reconhece o complexo receptor + hormônio é constituído por um número pequeno de nucleotídeos.

Considerando-se uma célula-alvo, verifica-se que somente alguns genes são afetados por determinado hormônio esteróide. Por exemplo, na célula hepática foram estudadas cerca de 1.000

proteínas diferentes. Quando a célula hepática é submetida ao hormônio esteróide **cortisol** (produzido pela camada cortical da glândula adrenal), apenas seis dessas proteínas aumentam de quantidade, enquanto uma diminui. O efeito do cortisol é reversível, e a velocidade de síntese das proteínas afetadas volta ao normal quando o hormônio é removido. Foi observado, também, que cada célula hepática contém cerca de 10.000 receptores e que a ativação de todos esses receptores pelo cortisol influencia apenas uns 50 genes, número muito menor do que o de segmentos de DNA que fixam o receptor ativado. Parece que muitos complexos de cortisol com o receptor se prendem a segmentos de DNA que não têm qualquer efeito sobre a síntese protéica.

Os genes regulados pelos hormônios esteróides são diferentes conforme o tipo de célula-alvo

Como acontece com os hormônios em geral, a resposta aos hormônios esteróides depende do próprio hormônio e das características da célula-alvo. Os receptores podem ser semelhantes, mas os genes ativados são diferentes, conforme o tipo celular. Diversos estudos mostraram que os receptores para **estradiol** e **progesterona** (hormônios femininos) e **cortisol** são iguais e são codificados por um único gene. Os receptores para o hormônio esteróide masculino **testosterona** é diferente e codificado por outro gene.

Na doença denominada **feminização testicular**, o paciente apresenta fenótipo feminino, embora seu genótipo seja masculino (XY). Essa doença é conseqüência de uma mutação no gene do receptor para a testosterona. O receptor ainda é capaz de se ligar à testosterona, mas a modificação conformacional que possibilita a ligação do receptor com o DNA é defeituosa. Dessa maneira, deixam de ser sintetizadas as proteínas que normalmente são produzidas em resposta à testosterona. Por outro lado, o mecanismo de retroalimentação que inibe a produção excessiva de testosterona não funciona, porque o hipotálamo também não tem receptores normais para testosterona, e a concentração de testosterona nos líquidos extracelulares se torna anormalmente alta. Como a testosterona é um precursor de estradiol (hormônio feminino), aumenta a concentração de estradiol e, sendo normais os receptores celulares para estradiol, desenvolve-se o fenótipo feminino.

Comunicação parácrina

No corpo dos animais, existem células especializadas na **secreção parácrina**, ou seja, na produção de **mediadores químicos de ação local**. Por exemplo, histamina e heparina são sintetizadas por células do tecido conjuntivo denominadas **mastócitos**. Esse tipo celular apresenta o citoplasma repleto de grânulos, que contêm os mencionados mediadores parácrinos. Os grânulos são expulsos dos mastócitos mediante estímulo imunitário, ação de agentes químicos, lesão tecidual e outros estímulos.

Muitas outras células, embora não especializadas nesse sentido, podem produzir diversos mediadores com ação local na inflamação, na proliferação celular, na contração da musculatura lisa dos vasos sangüíneos, tubo digestivo e brônquios, e na secreção celular. Como exemplo, serão mencionadas as **prostaglandinas**, produzidas praticamente por todas as células do organismo humano. Existem pelo menos 10 famílias de prostaglandinas, denominadas PGA, PGB, PGC, PGD, PGE, PGF, PGG, PGH, PGI e PGJ. Cada uma dessas famílias apresenta vários subtipos. As prostaglandinas têm efeitos extremamente variados, e apresentam grande interesse biológico e médico. Todas as prostaglandinas são derivadas de um ácido graxo com 20 átomos de carbono, o **ácido araquidônico**. Esse ácido graxo se forma, a partir dos fosfolipídios da membrana plasmática, pela ação de **fosfolipases** que são ativadas por estímulos específicos e inespecíficos, variáveis de uma célula para outra.

Seria impossível mencionar todos os efeitos das prostaglandinas. Elas parecem regular a flexibilidade dos eritrócitos, que se deformam para atravessar os capilares sangüíneos mais finos. Algumas prostaglandinas diminuem a secreção de ácido clorídrico pelas glândulas da mucosa do estômago e inibem a formação de úlceras pépticas (úlceras do estômago). Outras participam da regulação do aparelho reprodutor feminino, influindo no ciclo menstrual. Prostaglandinas estimulam a contração do músculo liso do útero, podendo induzir o aborto quando injetadas no saco amniótico do embrião durante o primeiro trimestre da gestação. Injeções endovenosas no nono mês de gestação induzem o parto.

Além das prostaglandinas, o ácido araquidônico da membrana plasmática dá origem a outros mediadores de ação local. Todos os mediadores derivados do ácido araquidônico são conhecidos pelo nome genérico de **eicosanóides**, e incluem as **prostaglandinas**, os **tromboxanos** e os **leucotrienos**. Todos esses compostos participam do processo inflamatório. Os antiinflamatórios de natureza esteróide, como a cortisona, inibem a liberação do ácido araquidônico a partir dos fosfolipídios da membrana, bloqueando assim a produção de todos os mediadores locais mencionados: prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. Os antiinflamatórios não-esteróides, como a aspirina e a indometacina, bloqueiam a formação de prostaglandinas e tromboxanos, mas não impedem a formação de leucotrienos.

Algumas células produzem o gás **óxido nítrico, NO**, que se dissolve e age como secreção parácrina (o óxido nítrico também é um neurotransmissor). Por exemplo, os macrófagos e os neutrófilos secretam óxido nítrico nos locais de inflamação, como parte do mecanismo para livrar os tecidos de microrganismos invasores. O papel do óxido nítrico como sinal parácrino foi bem estudado nas células que revestem internamente os vasos sangüíneos, chamadas **células endoteliais**. As células endoteliais têm receptores específicos que captam o neurotransmissor acetilcolina (receptores colinérgicos) liberado pelas terminações dos nervos do sistema autônomo parassimpático. Os receptores colinérgicos fazem conexão com uma proteína G, que estimula a formação de trifosfato de inositol, numa cadeia que leva à liberação de íons Ca^{2+} do seu reservatório no REL para o citosol da célula endotelial. O íon Ca^{2+} ativa a sintetase do óxido nítrico presente no citoplasma da célula endotelial, que, então, sintetiza esse gás. O óxido nítrico se difunde rapidamente, atravessa a membrana da célula endotelial e penetra, também por difusão passiva, no citoplasma da célula muscular lisa, que está muito próxima. No interior da célula muscular lisa, o NO se liga ao grupo prostético heme da enzima solúvel guanilato ciclase, ativando essa enzima. Em conseqüência, há aumento na concentração do mensageiro intracelular GMP cíclico (cGMP) no citosol da célula muscular lisa. O cGMP estimula uma cinase protéica específica, que fosforila certas proteínas responsáveis pelo relaxamento das células musculares lisas, o que leva à dilatação do vaso sangüíneo e ao aumento do fluxo de sangue no local.

O efeito vasodilatador do óxido nítrico veio explicar o mecanismo de ação da nitroglicerina, usada há muitos anos para o tratamento da dor da angina do peito, que é devida a uma diminuição do fluxo de sangue no músculo cardíaco. A nitroglicerina é transformada pelo organismo em óxido nítrico; esse gás relaxa a musculatura lisa dos vasos sangüíneos, aumentando o diâmetro dos vasos e o volume de sangue que é oferecido às células musculares estriadas do músculo cardíaco.

Moléculas neurotransmissoras são responsáveis pela transmissão de informações através das sinapses

As células nervosas ou **neurônios** são de forma e tamanho muito variados, porém, salvo raras exceções, apresentam **um corpo celular** ou **pericário**, do qual partem prolongamentos de dois tipos: os **dendritos** e o **axônio**. Este último termina por uma arborização: o **terminal axônico** (Fig. 6.2). Funcionalmente, os neurônios apresentam partes receptoras, condutoras e transmissoras de informações.

O centro trófico do neurônio é o seu pericário, que contém o núcleo, abundante retículo endoplasmático rugoso, muitos polirribosomas livres e aparelho de Golgi bem desenvolvido. É no pericário que tem lugar a síntese das macromoléculas, não só para o corpo celular, mas também para os dendritos e o axônio. O pericário é também receptor de mensagens trazidas pelas moléculas neurotransmissoras, liberadas pelos terminais axônicos de outros neurônios.

Os dendritos, em geral numerosos, porém curtos, são prolongamentos que se ramificam tais como os galhos de uma árvore (*dendro*, galho), tornando-se cada vez mais finos. Têm principalmente função receptora, aumentando muito a área para recepção de neurotransmissores.

Cada neurônio possui apenas um axônio, cujo diâmetro é constante em toda sua extensão, apesar de alguns axônios serem muito longos, podendo atingir 1 m de comprimento. O axônio apresenta muitos microtúbulos e filamentos intermediários, ambos em continuação com estruturas semelhantes existentes no pericário.

No fim de seu trajeto, o axônio se divide em numerosos ramos, formando o **terminal axônico**, onde são liberados os neurotransmissores que vão atuar sobre receptores situados na membrana da célula seguinte, que pode ser outra célula nervosa, uma célula muscular ou uma célula glandular.

O terminal axônico forma com a célula seguinte da cadeia uma estrutura de complexidade variável, a **sinapse**. As sinapses que se formam entre os axônios e as células (fibras) musculares esqueléticas são bem conhecidas pela facilidade de seu estudo, tanto por meio de técnicas fisiológicas como por meio de técnicas morfológicas. Essas sinapses são denominadas **placas motoras**.

O microscópio eletrônico mostra que, nas sinapses, as membranas das duas células são separadas por uma fenda de 20 nm: o **intervalo sináptico**. A membrana plasmática do terminal axônico é denominada membrana **pré-sináptica**, e a da célula seguinte, membrana **pós-sináptica** (Figs. 6.2 e 6.3). A membrana pós-sináptica contém receptores para o neurotransmissor liberado na membrana pré-sináptica. A resposta da transmissão sináptica é extremamente rápida, devido, principalmente, à pequena distância que o neurotransmissor atravessa, à riqueza de receptores e à grande afinidade entre os neurotransmissores e seus receptores.

Mas é preciso que o neurotransmissor seja inativado imediatamente, para que sua ação não permaneça muito tempo, o que diminuiria a capacidade da transmissão sináptica de graduar com precisão sua atividade. No caso da sinapse neuromuscular (placa motora), o transmissor é a acetil-colina, contida nas numerosas vesículas sinápticas do terminal axônico (Fig. 6.3). A acetilcolina é liberada por exocitose, atua sobre os receptores da membrana pós-sináptica, promovendo a contração da fibra muscular, e é imediatamente inativada por difusão e, principalmente, pela ação da enzima acetil-colinesterase. Essa enzima é produzida pela fibra muscular estriada e permanece ligada ao glicocálice dessas fibras na altura da sinapse.

A transmissão sináptica apresenta numerosas variações do modelo anteriormente descrito como exemplo, mas o estudo dessas variedades situa-se fora dos limites impostos a este livro. A variedade de moléculas neurotransmissoras é muito grande. Além da acetil-colina, podem-se mencionar, como exemplos: adrenalina, noradrenalina, ácido gama-aminobutírico ou GABA (*gama-amino-butiric acid*), dopamina, serotonina e glicina.

Muitas vezes, a mesma molécula pode agir como neurotransmissora e também por outro modo de comunicação. Por exemplo, a adrenalina e a noradrenalina, além de neurotransmissoras (sintetizadas nos neurônios e liberadas pelos axônios), são produzidas pela camada medular da glândula adrenal (endócrina) e distribuídas pelo corpo, atuando assim como hormônios.

A membrana interna da maioria das mitocôndrias contém receptores para os hormônios da tireóide (T3 e T4)

Já foi mencionado, neste capítulo, que os hormônios da tireóide agem sobre o DNA, através de receptores situados no citoplasma e no núcleo das células-alvo.

Apenas como exemplo da complexidade do assunto, será explicada, a seguir, a atuação dos hormônios da tireóide (T3 e T4) diretamente sobre as mitocôndrias.

Em animais com hipotireoidismo (deficiência em hormônios da tireóide), ocorrem alterações morfológicas e funcionais nas mitocôndrias. Nesses animais, a administração de T3 ou T4 aumenta a captação de ADP e a formação de ATP. Foi demonstrada a existência de um receptor específico para T3 e T4 na membrana mitocondrial interna, que é o local onde ocorre a fosforilação oxidativa. Esses receptores só existem nos tecidos que respondem aos hormônios da tireóide, estando ausentes dos tecidos reconhecidamente insensíveis a esses hormônios, como o encéfalo e o testículo. Foi observado, também, que as mitocôndrias das células do cérebro de ratos recém-nascidos possuem receptores para T3 e T4, mas esses receptores desaparecem com o crescimento do animal. Essas observações explicam por que o hipotireoidismo que se inicia em crianças recém-nascidas leva ao **cretinismo**, doença cujos sintomas decorrem, em grande parte, da deficiência no funcionamento do cérebro. Já o hipotireoidismo no adulto não causa cretinismo, mas outra doença denominada **mixedema**, que não envolve defeitos cerebrais.

Outra comprovação de que os hormônios da tireóide atuam diretamente sobre as mitocôndrias foi fornecida pela observação, *in vitro*, de que T3 e T4 aumentam o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias isoladas.

Sumário

A troca de informações entre as células que constituem o corpo de um ser pluricelular se estabelece já na fase embrionária, e mantém sua importância durante toda a vida do animal. Essas informações são transmitidas através de moléculas (sinais químicos) que percorrem distâncias diversas entre a célula emissora e a receptora do sinal.

Os sinais químicos possibilitam que as células se organizem em tecidos e que se constituam os órgãos, pela agregação coerente de tecidos diferentes. Esses sinais coordenam o crescimento e as funções dos diversos órgãos do corpo, controlam o metabolismo de células situadas em órgãos diferentes, coordenam a secreção das glândulas endócrinas e exócrinas, influenciam mecanismos de defesa como a fagocitose, o processamento de antígenos (moléculas estranhas) e a síntese de anticorpos (moléculas de defesa). Influenciam, também, a contração do coração, do músculo esquelético e do músculo liso localizado na parede de órgãos como o estômago, intestinos, útero e vasos sangüíneos. Quase todas as funções celulares são reguladas pela troca de sinais químicos entre elas.

A molécula sinalizadora é chamada ligante, *e a molécula celular que se prende ao ligante e possibilita a resposta chama-se* receptor.

Considerando-se principalmente a distância percorrida pela molécula sinalizadora e as características de seu trajeto, distinguem-se três tipos de comunicação:

1) a comunicação por meio de hormônios *que, transportados pelo sangue, vão agir a distância sobre as células que possuem os receptores respectivos, ditas* células-alvo;

2) a comunicação parácrina, *onde a molécula sinal difunde-se alguns milímetros ou centímetros no meio extracelular e vai atuar sobre células próximas; e*

3) a comunicação por meio de moléculas neurotransmissoras, *que ocorre nas* sinapses, *estruturas muito especializadas que conectam, funcionalmente, uma célula nervosa (neurônio) com outra, ou com células musculares ou glandulares. Um prolongamento do* neurônio, *denominado* axônio, *conduz as moléculas neurotransmissoras e as libera no terminal axônico, que é um dos componentes da sinapse. Na sinapse, a membrana do* terminal axônico *e a da célula receptora do sinal (outro neurônio, uma célula muscular ou glandular) estão separadas por um espaço de apenas 20 nm.*

Muitas moléculas sinalizadoras podem agir por mais de um dos tipos de transmissão mencionados. Como exemplo, podem ser citados os hormônios adrenalina e noradrenalina, produzidos pela camada medular das glândulas adrenais. Essas moléculas são sintetizadas, também, pelas células nervosas e liberadas em certos terminais axônicos. Portanto, a noradrenalina e a adrenalina agem como hormônios e como neurotransmissores.

Cerca de 80% dos hormônios são moléculas hidrossolúveis (polipeptídeos, proteínas) e se ligam a receptores que são proteínas integrais da membrana das células-alvo. Ao se combinarem aos respectivos hormônios, os receptores acionam os mecanismos intracelulares que aumentam a concentração de Ca^{2+} *ou de* cAMP *(adenosina-monofosfato cíclico).*

Os hormônios lipossolúveis, como os hormônios esteróides da camada cortical da glândula adrenal, os dos ovários (estrógenos, progesterona) e dos testículos (testosterona), bem como os hormônios da glândula tireóide (T3 e T4), que são aminoácidos modificados, atravessam facilmente a membrana celular e penetram na célula, indo agir sobre receptores específicos localizados no citoplasma e no núcleo. Ao se combinarem com os respectivos hormônios, esses receptores adquirem afinidade para determinadas seqüências nucleotídicas do DNA, com as quais se combinam de modo reversível. Essa combinação altera a atividade dos genes próximos, que passam, geralmente, a produzir maior quantidade dos respectivos RNAs mensageiros, mas algumas vezes há diminuição e não aumento da transcrição gênica.

Como exemplo da comunicação com células próximas (secreção parácrina), *pode ser citada a histamina produzida pelos mastócitos, substância que tem ação sobre as células musculares lisas, células do endotélio dos capilares sangüíneos e outras. Outros mediadores parácrinos são derivados do ácido graxo araquidônico (20 átomos de carbono), como as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. Os derivados do ácido araquidônico desempenham papel relevante na defesa, através do mecanismo genericamente chamado inflamação.*

Os neurotransmissores são de ação rápida, de breve duração e participam das funções cerebrais superiores e do controle da contração muscular e da secreção das glândulas endócrinas e exócrinas. A neurotransmissão depende de estruturas altamente especializadas, as sinapses. Nessas estruturas, o espaço entre a membrana da célula transmissora e da célula receptora é de apenas 20 nm. Os receptores dos neurotransmissores estão sempre localizados na membrana da célula receptora, nos locais das sinapses.

Bibliografia

BARRIT, G.J. *Communication within Animal Cells.* Oxford Univ. Press, 1992.

BERRIDGE, M. The molecular basis of communication within the cell. *Sci. Am., 253*(4):142, 1985.

EVANS, R.M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science, 240*:889, 1988.

GERDAY, C.; GILLES, R. and BOLIS, L. (eds.) *Calcium and Calcium Binding Proteins.* Springer Verlag, 1988.

HADLEY, M.E. *Endocrinology.* Prentice-Hall, 1984.

HECKER, M.; FOEGH, M.L. and RAMWELL, P.W. The eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes, related components. *In:* KATZUNG, B.G. (ed.) *Basic and Clinical Pharmacology*, 4th ed., Appleton and Lange, 1989, pages 228-254.

LEVITZKI, A. From epinephrine to cyclic AMP. *Science, 241*:800, 1988.

PLAUT, M. Lymphocyte hormone receptors. *Ann. Rev. Immunol., 5*:621, 1987.

ROTH, J. and TAYLOR, S.J. Receptors for peptide hormones: alterations in disease of humans. *Ann. Rev. Physiol., 44*:639, 1982.

SNYDER, S.H. The molecular basis of communication between cells. *Sci. Am., 253*(4):132, 1985.

WILSON, J.D. and FOSTER, D.W. *William's Textbook of Endocrinology.* 7th ed. Saunders, 1985.

7

Bases Moleculares do Citoesqueleto e dos Movimentos Celulares

Roteiro

- *O citoesqueleto mantém a forma das células e é responsável pela contração celular, pelos movimetos da célula e pelo deslocamento de organelas, vesículas e partículas no citoplasma.*
- *Microfilamentos de actina, filamentos de miosina, microtúbulos e proteínas motoras são os principais constituintes do citoesqueleto e responsáveis pelos movimentos celulares.*
- *Os microfilamentos de actina, por meio de diversas proteínas, se fixam na membrana plasmática, no envoltório nuclear e em outros componentes das células.*
- *Modificações da estrutura protéica quaternária causam movimentos de contração em certos bacteriófagos (vírus que parasitam bactérias).*
- *Nas células eucariontes, grande parte dos movimentos é devida a deslizamentos de filamentos de actina e de miosina.*
- *As células musculares são especializadas para a contração.*
- *A unidade contrátil das células musculares estriadas é o sarcômero.*
- *Cada sarcômero é separado do outro por uma estria Z.*
- *No sarcômero, além dos filamentos de actina e miosina, encontram-se outras proteínas, que participam do controle da contração.*
- *Ao chegar à fibra muscular estriada, o impulso nervoso causa um fluxo de íons Ca^{2+} para o citoplasma, que desencadeia a contração muscular.*
- *As células mioepiteliais são contráteis e ajudam a expulsar a secreção das glândulas exócrinas.*
- *A citocinese é um caso especial de contração, envolvendo actina e miosina, para separar as células-filhas no fim da mitose.*
- *Os movimentos dos cílios e flagelos das células eucariontes são devidos à atividade de microtúbulos, e não ao sistema actina-miosina.*

Muitas células têm forma irregular, existindo algumas, como os neurônios ou células nervosas, com prolongamentos muito longos. Além disso, o núcleo, organelas, grânulos de secreção e outros componentes celulares têm localização definida, quase sempre constante, conforme o tipo celular. Essas observações levaram os citologistas clássicos a admitirem a existência de um **citoesqueleto** que desempenharia apenas um papel mecânico, de suporte, mantendo a forma celular e a posição de seus componentes. Estudos posteriores, além de confirmarem a existência do citoesqueleto, mostraram que seu papel funcional é muito mais amplo. Ele estabelece, modifica e mantém a forma das células. É responsável também pelos movimentos celulares como contração, formação de pseudópodos e deslocamentos intracelulares de organelas, cromosomas, vesículas e grânulos diversos.

Os principais elementos do citoesqueleto são os **microtúbulos, microfilamentos de actina, filamentos de miosina, filamentos intermediários** e macromoléculas protéicas diversas, que formam um conjunto dinâmico. Apenas os filamentos intermediários são praticamente estáveis.

Microtúbulos

A microscopia eletrônica mostrou que o citoplasma contém cilindros muito delgados e longos, denominados **microtúbulos,** com 24 nm de diâmetro. Cada microtúbulo é formado pela associação de dímeros protéicos que se arrumam em hélice (Figs. 7.1 e 7.2). Os dímeros têm um peso aproximado de 110.000 dáltons e são constituídos por duas cadeias polipeptídicas de estruturas semelhantes, mas não iguais, chamadas **tubulinas alfa** e **beta,** que formam um dímero. Em corte transversal ao microtúbulo, sua parede mostra-se constituída por um anel com 13 dímeros (Figs. 7.1, 7.2 e 7.3). Os microtúbulos estão em constante reorganização, crescendo em uma extremidade graças à polimerização local dos dímeros de tubulina, e diminuindo na outra extremidade graças à despolimerização local. A extremidade que cresce é denominada **extremidade mais** (+) e a outra é a **extremidade menos** (−). Os processos de encurtamento e alongamento dos microtúbulos são devidos a um desequilíbrio entre polimerização e despolimerização.

O citosol ou matriz citoplasmática contém um *pool* de dímeros de tubulina, de modo que a formação de microtúbulos não depende da síntese protéica concomitante. A polimerização desses dímeros de tubulina para formar microtúbulos é regulada pela concentração de íons Ca^{2+} e pelas **proteínas associadas aos microtúbulos (MAPS,** "microtubule associated proteins"). A concentração de íons Ca^{2+} atua de modo mais rápido nas polimerizações de curta duração, e as MAPS participam principalmente das polimerizações mais duráveis. Nas células, a estabilidade dos microtúbulos é muito variável. Os dos cílios, por exemplo, são muito estáveis, os do fuso mitótico se formam na mitose e desfazem com o término desse processo, e os microtúbulos dispersos no citoplasma têm vida mais curta. Existe na célula um intercâmbio constante entre os dímeros de tubulina livres no citoplasma e os dímeros polimerizados em microtúbulos.

Os microtúbulos são encontrados com freqüência no citoplasma de todas as células. O estudo de suas funções tem mostrado que eles participam da movimentação de cílios e flagelos, transporte intracelular de partículas, deslocamento dos cromosomas na mitose, estabelecimento e manutenção da forma das células

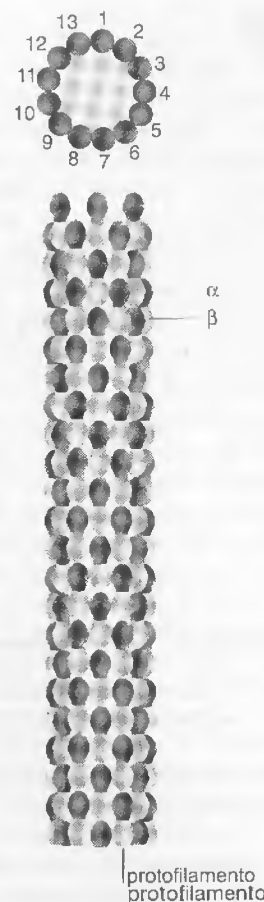


Fig. 7.1 Desenho de microtúbulo mostrando as duas subunidades (α e β) que constituem a molécula de tubulina. O arranjo das moléculas de tubulina cria 13 protofilamentos, que constituem a parede do microtúbulo. O número de protofilamentos fica bem visível no corte de microtúbulo que aparece na parte superior da ilustração.

etc. A participação dos microtúbulos no citoesqueleto foi bem estudada, tomando-se como modelo os heliozoários. Estes protozoários são envoltos por expansões muito finas do citoplasma, os **axonemas,** que se dispõem radialmente em relação à célula (Fig. 7.4A). Nas micrografias eletrônicas, observa-se que os axonemas contêm numerosos microtúbulos, dispostos ordenamente em espiral (Fig. 7.5A). Interessante é que, submetendo-se esses protozoários à ação da uréia, os axonemas entram em colapso e se retraem (Fig. 7.4B). Retirando-se a uréia do meio, os axonemas regeneram-se em menos de meia hora. O estudo deste fenômeno com o microscópio eletrônico mostrou que, durante o colapso dos axonemas, ocorre uma despolimerização dos microtúbulos, com acúmulo das moléculas globosas de tubulina no citoplasma (Fig. 7.5B). Com a retirada da uréia, os microtúbulos se repolimerizam e reaparecem os axonemas.

Drogas que interferem com os microtúbulos

Diversas moléculas agem sobre os microtúbulos, interferindo com o papel dessas estruturas nos processos celulares dos quais elas participam. Na década de 30, observou-se que o alcalóide **colchicina** paralisa a mitose na metáfase, e, desde então, a colchicina tem sido usada nos estudos sobre os cromosomas e a

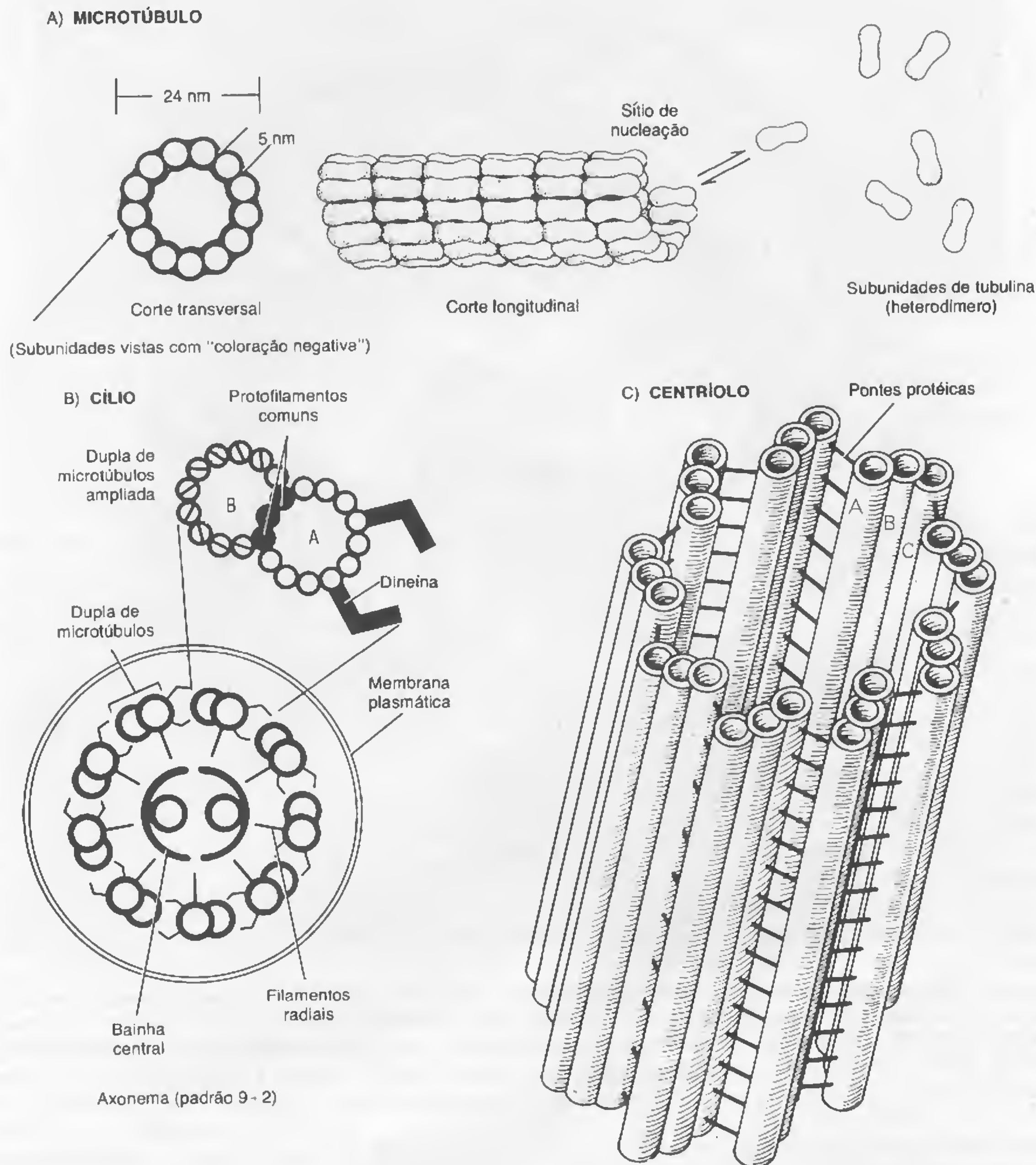


Fig. 7.2 Representação esquemática de microtúbulos, cílio e centríolo. **A.** Microtúbulos vistos ao microscópio eletrônico após fixação com glutaraldeído e ácido tânico. As subunidades de tubulina, não-coradas, são delineadas pelo ácido tânico, que é elétron-denso. O corte transversal dos túbulos revela um anel de 13 subunidades. Os microtúbulos podem modificar seu tamanho pela perda de tubulina numa das extremidades e adição na outra extremidade. **B**. O corte transversal de um cílio revela uma parte central formada de microtúbulos, o axonema, que consiste em 2 microtúbulos centrais, circundados por 9 duplas de microtúbulos. Nas duplas, o microtúbulo A é completo, com 13 subunidades, enquanto o microtúbulo B tem 2 ou 3 subunidades comuns com o microtúbulo A. Quando ativados, os braços de dineína ligam-se ao microtúbulo adjacente e promovem o encurvamento dos microtúbulos, desde que exista ATP para fornecer energia. **C**. Centríolos consistem em 9 trincas de microtúbulos unidas por pontes protéicas. Em cada trinca, o microtúbulo A é completo e consiste em 13 subunidades, enquanto os microtúbulos B e C têm subunidades de tubulina em comum.

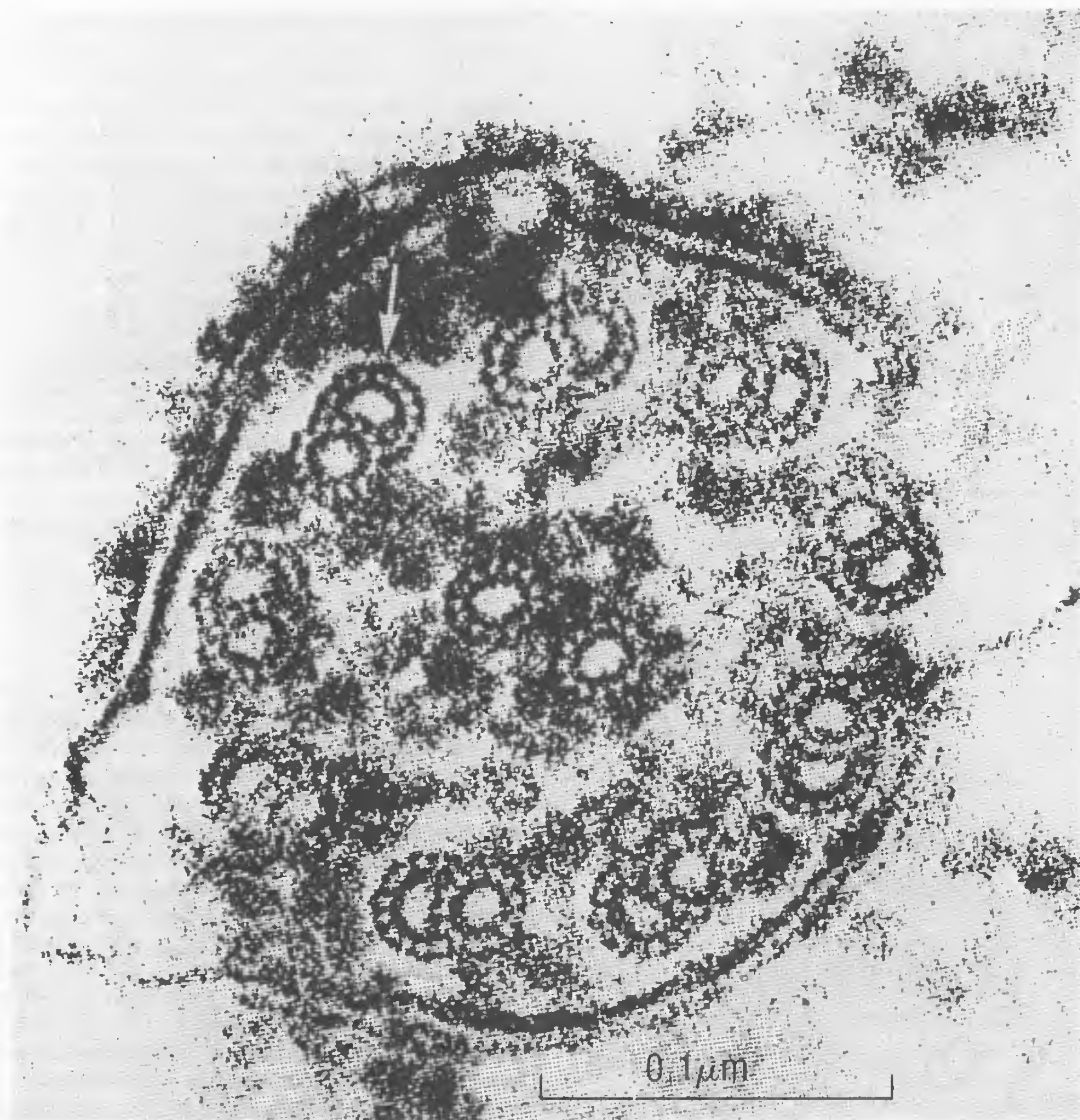


Fig. 7.3 Micrografia eletrônica mostrando as moléculas protéicas que constituem os microtúbulos (seta). Corte transversal de cauda de espermatozóide de rato fixado em mistura de glutaraldeído e ácido tânico. Este ácido promove a deposição de ácido ósmico, usado como contraste, na periferia das moléculas protéicas, que aparecem como pontos brancos constituindo a parede dos microtúbulos (seta). Cortesia de V. Mizuhira.

divisão celular. Estudos posteriores mostraram que a colchicina se combina especificamente com os dímeros de tubulina e causa o desaparecimento dos microtúbulos menos estáveis, incluindo os do fuso mitótico. Os microtúbulos dos cílios e flagelos são resistentes à colchicina, talvez devido às proteínas (MAPS) a eles associadas. A colchicina se combina com os dímeros de tubulina, e, quando o complexo colchicina-tubulina é integrado no microtúbulo, impede a adição de novas moléculas de tubulina na extremidade mais (+) de microtúbulo. Como a despolimerização não cessa, não havendo adição de novos dímeros, o microtúbulo se desintegra.

Outro alcalóide que interfere com os microtúbulos é o **taxol**, porém, em nível molecular, seu efeito é contrário ao da colchicina. O taxol acelera a formação de microtúbulos e os estabiliza, interrompendo a despolimerização. Toda a tubulina do citoplasma se polimeriza em microtúbulos muito estáveis. Desse modo, na mitose, não há tubulina livre no citoplasma para formar os microtúbulos do fuso, e a mitose não se processa. Portanto, os efeitos da colchicina e do taxol sobre a mitose são iguais, embora um destrua e o outro estabilize microtúbulos, o que mostra a importância do sistema formado por tubulina livre e tubulina polimerizada.

O taxol é empregado no tratamento de tumores malignos por sua capacidade de impedir a formação do fuso mitótico, atuando como poderoso antimitótico. A colchicina é usada em medicina para o tratamento da gota, desde a antiguidade até nossos dias, embora o mecanismo de ação, neste caso, não esteja ainda esclarecido.

Vincristina e vimblastina são drogas também usadas no tratamento dos tumores malignos porque, como a colchicina e o taxol, impedem a formação dos microtúbulos do fuso mitótico.

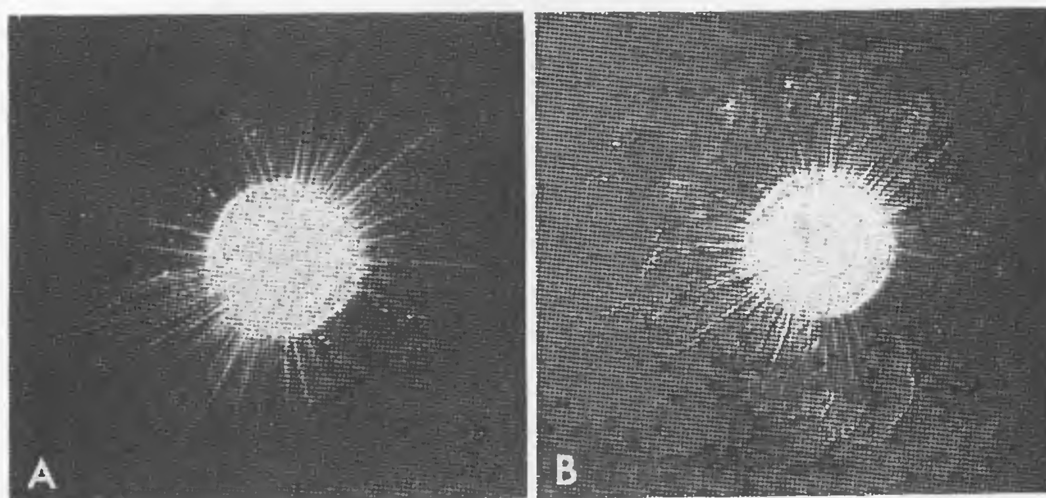


Fig. 7.4 Fotomicrografias de heliozoário mostrando os efeitos de uma solução diluída (0,15 M) de uréia sobre os axonemas. Em **A** aparece o protozoário normal e, em **B**, após destruição dos microtúbulos pela uréia. Notar o colapso dos axonemas causado pela uréia. Aumento: 2.500 ×. (Fotografias publicadas por Shigenaka, Y., L. E. Roth and D. J. Pihlaja, *J. Cell Sci.*, *8*:127, 1971. Reproduzidas com permissão.)

Microtúbulos dos centríolos

Cada célula possui **um par de centríolos,** que se localiza próximo ao núcleo e ao aparelho de Golgi, numa região denominada **centrosoma ou centro celular.** O centrosoma, que em algumas células não contém centríolo, é constituído por um material amorfo de onde se originam microtúbulos. Por isso, o centrosoma é um MTOC, "**microtubule organizing center**". Ao microscópio óptico, o centrosoma aparece como um corpúsculo esférico, muito pequeno e demonstrável apenas por colorações especiais.

O microscópio eletrônico mostrou que cada centríolo é um cilindro medindo 150 nm de diâmetro por 300 a 500 nm de comprimento. A disposição dos centríolos de cada par é muito típica e constante, pois eles se dispõem sempre de modo que um centríolo forme um ângulo reto com o outro.

Cada centríolo é constituído por um material amorfo no qual estão colocados 27 microtúbulos. Esses microtúbulos dispõem-se em 9 feixes, cada um deles com 3 microtúbulos paralelos. Os 3 microtúbulos de cada feixe são presos entre si (Fig. 7.2).

Os **corpúsculos basais,** onde se inserem os cílios e os flagelos, têm estrutura exatamente igual à dos centríolos. Portanto, centríolos e corpúsculos basais são apenas aspectos funcionais diferentes de um mesmo tipo de organela.

Microfilamentos de actina

Esses microfilamentos (Fig. 7.6) são formados por duas cadeias em espiral de monômeros globosos da proteína actina G, que se polimerizam lembrando dois colares de pérolas enrolados, formando uma estrutura quaternária fibrosa (actina F). São filamentos finos, com 5-7 nm de diâmetro. Muito abundante no músculo, a actina é encontrada também, embora em menor quantidade, no citoplasma de todas as células, onde constitui 5-30% das proteínas totais do citoplasma.

Já foram descritos seis tipos de moléculas de actina, extraídos de células dos animais ou de células humanas. Trata-se de uma proteína extremamente conservada durante a evolução. Mais de 80% das seqüências de aminoácidos são exatamente iguais em todos os tipos de actina. As diferenças na seqüência de aminoácidos estão localizadas na extremidade —NH_2 da molécula, e parecem ter influência muito pequena na velocidade da polimerização dos monômeros de actina.

Diversas drogas que influem sobre a estrutura dos microfilamentos de actina, como as **citocalasinas** e as **faloidinas** (ambas extraídas de fungos), interferem com os movimentos celulares, e têm sido usadas em experimentos sobre esses movimentos. As citocalasinas se combinam com as moléculas de actina e impedem a polimerização dessas moléculas para formar microfilamentos. As faloidinas se combinam lateralmente com os microfilamentos de actina, estabilizando-os. Tanto as citocalasinas como as faloidinas impedem os movimentos dependentes da actina. Como no caso dos microtúbulos, tanto a destruição como a estabilização de microfilamentos têm o mesmo efeito, mostrando que o dinamismo entre os monômeros de actina dos microfilamentos e os do *pool* citoplasmático é essencial para a função desses microfilamentos. Todavia, nem todos os microfilamentos de actina são igualmente sensíveis a essas drogas. Os microfilamentos das células não musculares são os mais sensíveis.

Filamentos intermediários

São chamados assim por seu diâmetro de 8-10 nm, intermediário entre o dos filamentos de miosina e o dos microfilamentos de actina.

Os filamentos intermediários (Figs. 7.7 e 7.8) são mais estáveis do que os microtúbulos e microfilamentos, e não são constituídos de monômeros precursores que constantemente se agregam e se separam, em equilíbrio com um *pool* citoplasmático. Quando a célula é rompida experimentalmente, os microtúbulos e microfilamentos se solubilizam, mas 99% dos filamentos intermediários permanecem intactos. Uma vez formados, os filamentos intermediários permanecem por longo tempo no citoplas-

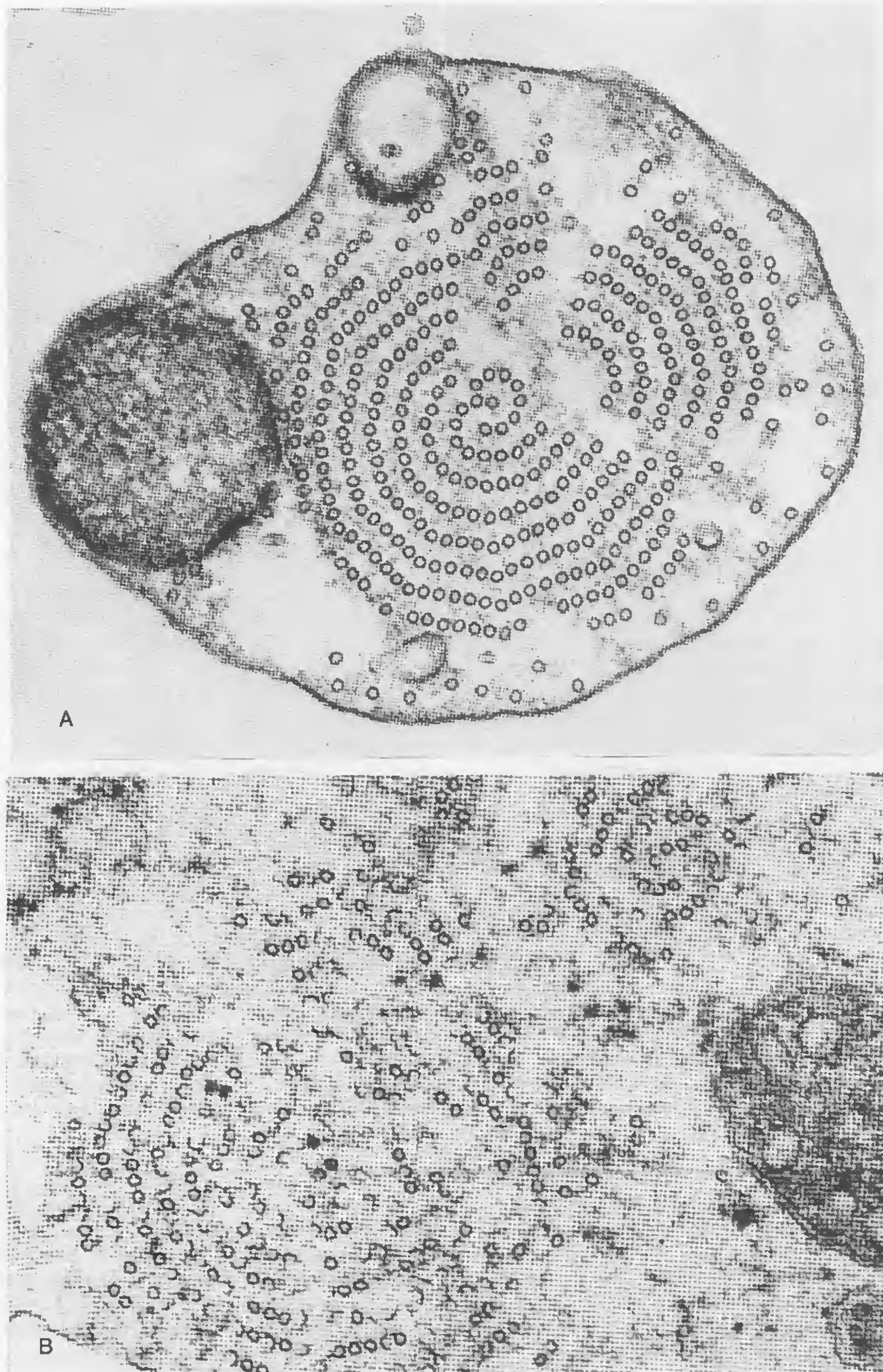


Fig. 7.5 A. Eletromicrografia. Corte de axonema de heliozoário normal. Notar que, no corte, os microtúbulos mostram um arranjo em espiral. Cada microtúbulo aparece como um anel elétron-denso. Comparar com a Fig. 7.4**A**. **B.** Eletromicrografia. Corte de axonema de heliozoário exposto durante 10 minutos a uma solução 0,15 M de uréia. Muitos microtúbulos estão destruídos e a organização em espiral desapareceu. Comparar com a Fig. 7.4**B**. (Fotografias publicadas por Shigenaka, Y., L. E. Roth and D. J. Pihlaja. *J. Cell Sci.*, *8*:127-151, 1971. Reproduzidas com permissão.)

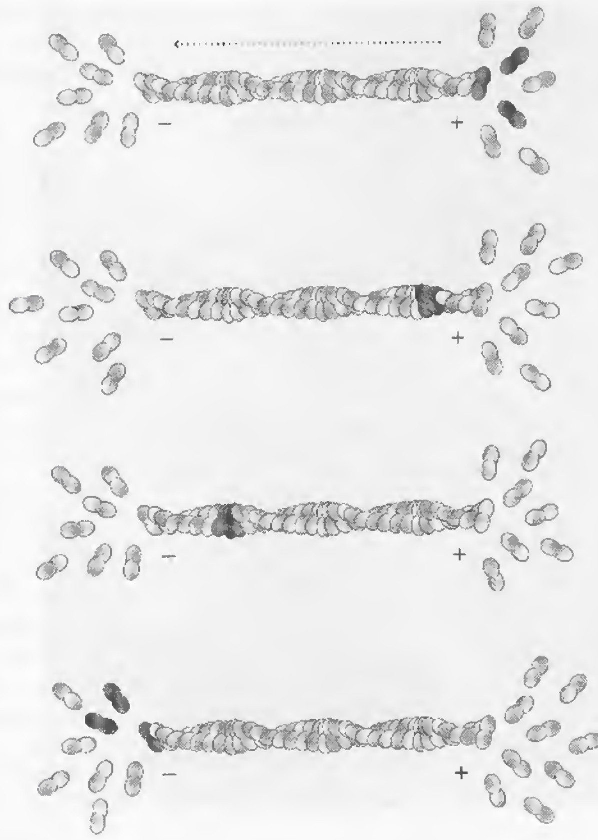


Fig. 7.6 Desenho mostrando que o microfilamento de actina é uma estrutura dinâmica, recebendo subunidades por uma extremidade, denominada extremidade mais (+), e perdendo subunidades pela extremidade menos (–). Esse dinamismo permite que o microfilamento se adapte com grande rapidez às necessidades da célula. Só por exceção, como na fibra muscular estriada, o microfilamento de actina é estável.

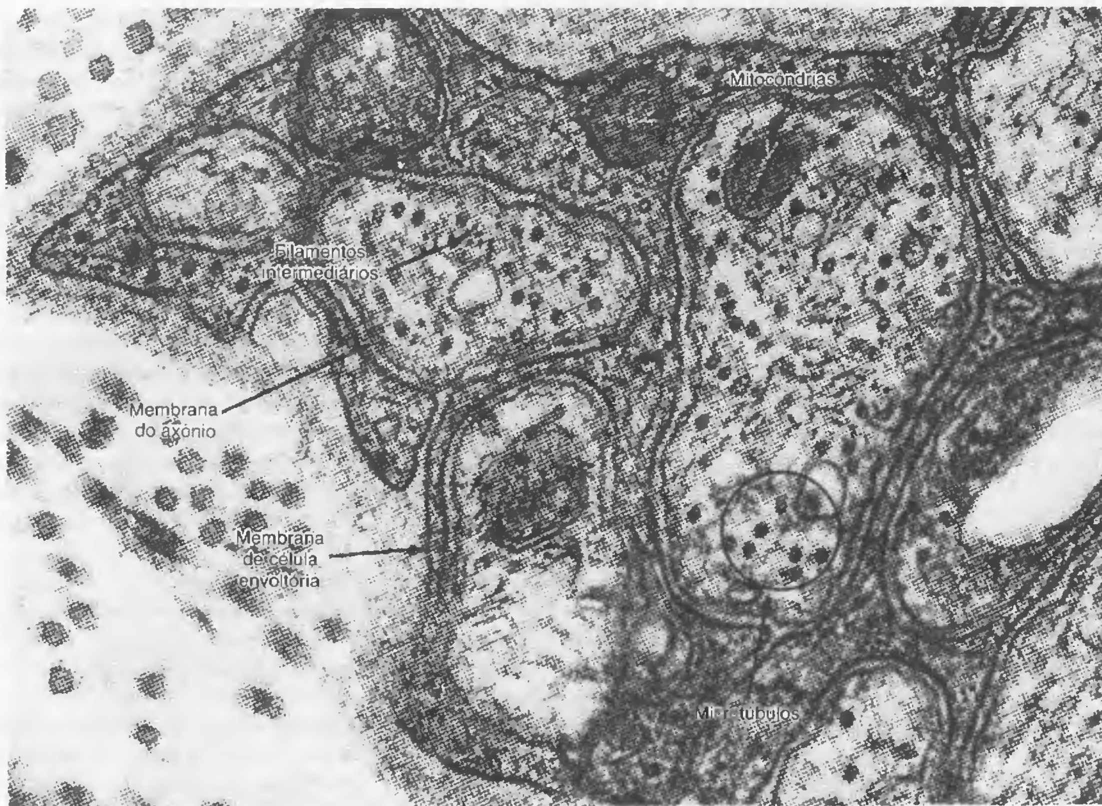


Fig. 7.7 Eletromicrografia mostrando microtúbulos e filamentos intermediários. Corte de prolongamentos (axônios) de células nervosas humanas. Aumento: 80.000 ×.

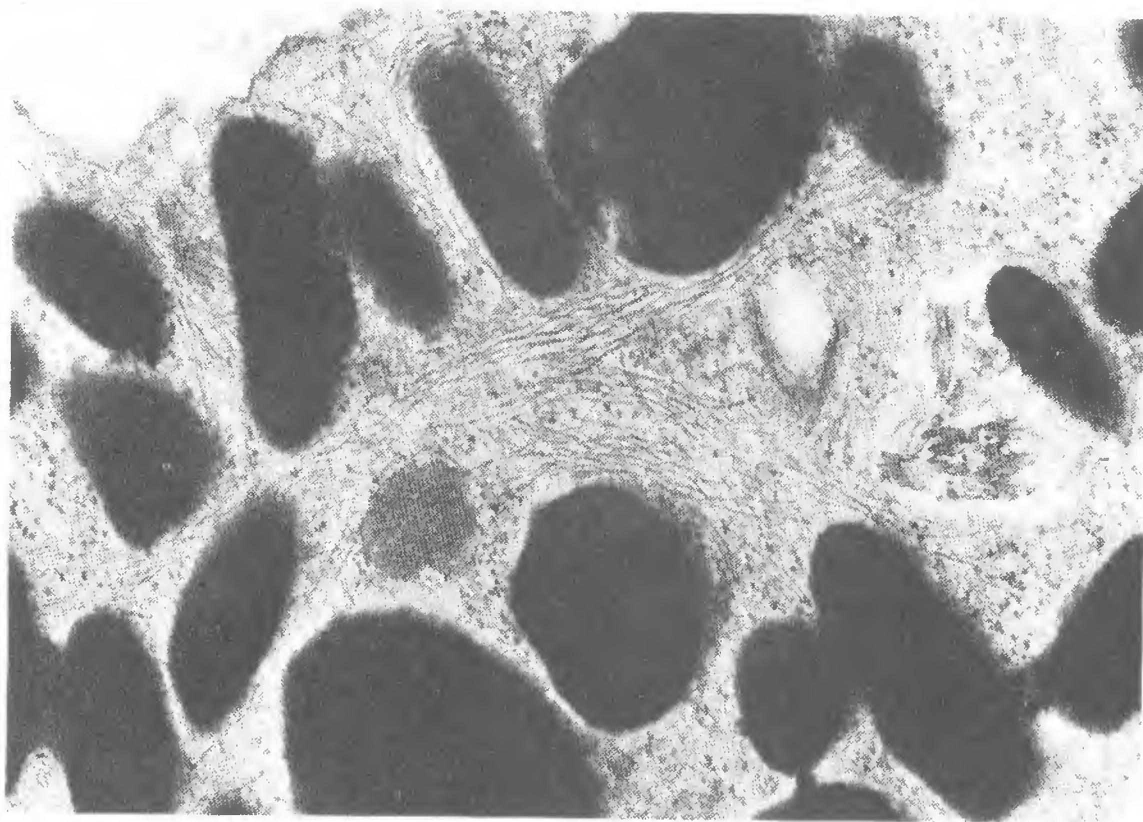


Fig. 7.8 Eletromicrografia de melanócito. Entre os grânulos escuros de melanina, aparecem numerosos filamentos intermediários. Aumento: 50.000 ×.

ma. Esses filamentos não têm participação direta na contração celular, nem nos movimentos de organelas, sendo primordialmente elementos estruturais.

Os filamentos intermediários são abundantes nas células que sofrem atrito, como as da epiderme, onde se prendem a especializações da membrana plasmática denominadas **desmosomas** que unem as células umas às outras. Também são freqüentes nos **axônios**, que são prolongamentos das células nervosas ou neurônios, e em todos os tipos de células musculares. As células que se multiplicam muito freqüentemente, como nas culturas e nos embriões muito jovens, são desprovidas de filamentos intermediários. Estes filamentos também estão ausentes nas células que produzem mielina no sistema nervoso central (oligodendrócitos). Como será visto logo a seguir, os filamentos intermediários dos fibroblastos são constituídos pela proteína vimentina. Foi observado experimentalmente que a injeção intracelular de anticorpo contra vimentina, embora destrua os filamentos intermediários dos fibroblastos, não tem qualquer efeito aparente sobre estas células, que continuam se dividindo normalmente. Esse experimento, mais a observação de que células embrionárias jovens não possuem filamentos intermediários, faz supor que as funções desses filamentos dizem respeito às atividades especializadas das células diferenciadas (secreção, movimentação, proteção mecânica).

Todos os filamentos intermediários têm a mesma estrutura, sendo constituídos pela agregação de moléculas alongadas, cada uma formada por três cadeias polipeptídicas enroladas em hélice. Ao contrário dos microtúbulos e microfilamentos que, em todas as células, são constituídos pelas proteínas globulares tubulina e actina, respectivamente, os filamentos intermediários são formados por diversas proteínas fibrosas (moléculas muito alongadas): **queratina, vimentina, proteína ácida fibrilar da**

Tabela 7.1 Proteínas que constituem os filamentos intermediários

Proteína e peso molecular expresso em dáltons	Localização
citoqueratinas (mais de 20 tipos, 40.000-70.000)	células epiteliais e estruturas formadas por elas como unhas, pêlos e chifres
vimentina (54.000)	maioria das células originadas do mesênquima embrionário; algumas vezes é produzida apenas transitoriamente durante o desenvolvimento embrionário
desmina (53.000)	células musculares lisas, esqueléticas e do miocárdio
proteína ácida fibrilar da glia (50.000)	dois tipos de células da glia: astrócitos e células de Schwann
proteína dos neurofilamentos(60.000-130.000)	corpo celular e prolongamentos dos neurônios (principalmente axônios)
laminas A, B e C (65.000-75.000)	lâmina nuclear, estrutura em grade que reforça internamente o envoltório nuclear

glia, **desmina, lamina** e **proteínas dos neurofilamentos** (Tabela 7.1). Essas proteínas se agregam espontaneamente, sem necessidade de energia, para montar os respectivos filamentos intermediários. Vimentina, proteína ácida fibrilar da glia e desmina, são proteínas assemelhadas, e, por isso, são freqüentes os filamentos intermediários de vimentina mais essas outras proteínas.

Os filamentos intermediários constituídos de **queratina** são encontrados exclusivamente nas células epiteliais e em estruturas delas derivadas, como pêlos, unhas e chifres. Existem quase 30 tipos diferentes de queratina, codificadas por igual número de genes. Já foi identificada uma doença humana, rara, originada de mutação dos genes que codificam as queratinas das células da camada basal da epiderme. A rede de filamentos intermediários de queratina nessas células torna-se frágil. Em conseqüência, a camada basal da epiderme se rompe ao menor atrito, originando espaços entre as células. Estes espaços se enchem de líquido oriundo do tecido conjuntivo da derme, formando-se bolhas.

Os filamentos intermediários formados pela proteína **vimentina** são os mais freqüentes, encontrados nos fibroblastos e em todas as células de origem mesenquimal (células descendentes do tecido embrionário denominado mesênquima).

A **desmina** é encontrada nos filamentos intermediários das células musculares lisas e nas linhas Z das células musculares estriadas esqueléticas e cardíacas.

Os astrócitos e células de Schwann, constituintes do tecido nervoso, apresentam filamentos intermediários de **proteína ácida fibrilar da glia** ou **GFAP** (*glial fibrillary acidic protein*).

Os **neurofilamentos** são constituintes do corpo celular e dos prolongamentos dos neurônios, sendo particularmente abundantes nos axônios.

Existem três variedades de laminas, denominadas A, B e C, que participam da constituição da **lâmina nuclear**, uma estrutura em forma de rede que reforça a superfície interna do envoltório nuclear. Assim, ao contrário das outras proteínas de filamentos intermediários que são citoplasmáticas, a lamina é um componente do núcleo celular.

Os filamentos intermediários são específicos para os diversos tecidos, o que tem sido utilizado para caracterizar, nas biópsias de tumores e suas metástases, os tecidos de origem, informação muitas vezes importante para orientar o tratamento. Por exemplo, a detecção de queratina por imunocitoquímica indica que o tumor é de origem epitelial, e a variedade de queratina observada pode informar quanto ao tipo de epitélio onde se formou o tumor.

As micrografias eletrônicas têm mostrado que os filamentos intermediários podem ligar-se aos microtúbulos, microfilamentos, mitocôndrias, grupos de ribosomas, envoltório nuclear e membrana plasmática, através de pontes delgadas formadas por moléculas protéicas. A associação com microtúbulos é particularmente evidente em certos prolongamentos (axônios) das células nervosas. A dissolução dos microtúbulos de fibroblastos, por meio da colchicina, modifica a posição dos filamentos intermediários de vimentina. Enquanto os microtúbulos estão intactos, os filamentos de vimentina percorrem todo o citoplasma, mas, após a desmontagem dos microtúbulos pela colchicina, os filamentos de vimentina, demonstráveis por imunofluorescência, aglutinam-se em volta do núcleo do fibroblasto. Isto indica que os microtúbulos influem na disposição dos filamentos intermediários.

Nas células até o momento estudadas a este respeito, como os linfócitos e os fibroblastos, foi observado que os filamentos intermediários se organizam num sistema amplo no citoplasma, indo desde o envelope nuclear até a membrana citoplasmática.

Movimentos celulares

O exame microscópico da célula viva mostra que ela se contrai e se expande, em grau variável, conforme a célula em estudo. Suas organelas não são fixas, mas deslocam-se de um local para outro no interior da célula. Embora algumas vezes seja difícil afirmar que esses movimentos não sejam ao acaso, na maioria das vezes é claro que a movimentação intracelular de organelas e grânulos diversos é ordenada e está relacionada com as funções celulares. São exemplos os movimentos cromosômicos na mitose, os movimentos dos grânulos de secreção, das mitocôndrias e muitos outros.

O estudo da movimentação celular é um exemplo da importância das forças fracas de interação macromolecular na vida das células. De fato, nos processos que serão estudados a seguir fica claro como estas interações, individualmente fracas, quando em grande número podem gerar forças fortes, facilmente reversíveis, e de potência tal que permitem a um homem levantar pesos de mais de 100 kg, pela contração simultânea de grande número de fibras musculares esqueléticas.

Os filamentos de **actina** e de **miosina,** os **microtúbulos** e as **proteínas motoras** são responsáveis pela maioria dos movimentos celulares. Entre as moléculas desses componentes se estabelecem ligações químicas fracas e reversíveis, não-covalentes, responsáveis pela força motriz.

Para fins didáticos, os movimentos celulares podem ser divididos em dois grupos, a saber:

1. Movimentos que levam a modificação na forma das células. Esses processos são ilustrados pela contração das células musculares, células mioepiteliais, células endoteliais, células mióides e outras. O movimento amebóide, pelo qual células livres como os macrófagos e leucócitos se locomovem, e a divisão celular durante a mitose também estão incluídos neste grupo.

2. Movimentos que não levam a modificação na forma das células. Este grupo inclui todos os processos de transporte intracelular de material não acompanhado por deformação celular, como, por exemplo, nas correntes citoplasmáticas ou ciclose bem visível e estudada nas células vegetais. É o que ocorre também no transporte de material ao longo dos prolongamentos das células nervosas, transporte de grânulos de pigmento nas células pigmentares e na extrusão dos grânulos de secreção das células glandulares.

Os raros movimentos dos vírus são devidos a modificação na estrutura quaternária das proteínas

Esse mecanismo foi observado em certos bacteriófagos nos quais ocorre o encurtamento da cauda durante a injeção do material gênico na bactéria parasitada. Esse tipo de vírus é constituído essencialmente por uma cabeça, contendo um filamento de DNA, e pela cauda (Fig. 7.9). Verificou-se que, quando da introdução do material gênico presente na sua cabeça para dentro da bactéria, a cauda do bacteriófago sofre um processo de alargamento, tornando-se ao mesmo tempo mais curta. Essa cauda é uma macromolécula protéica cuja estrutura quaternária é constituída por moléculas protéicas globosas (monômeros) que se associam em espiral, formando um tubo comprido e estreito que mede 80 × 16,5 nm. Durante a injeção do material gênico nas

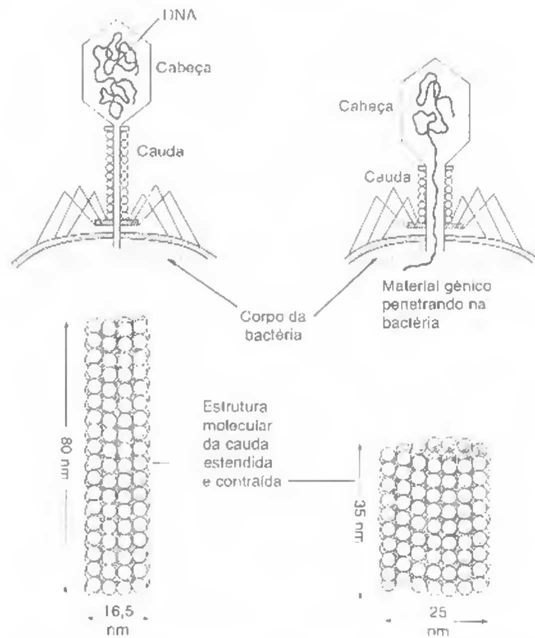


Fig. 7.9 Desenho esquemático de bacteriófago com a sua cauda estendida (**esquerda**) e contraída (**direita**). Observe que a cauda, ao se contrair, diminui de extensão e aumenta de diâmetro graças ao deslizamento de proteínas globulares entre si.

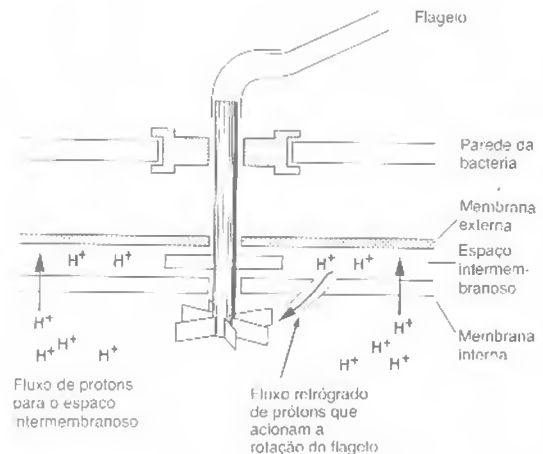


Fig. 7.10 Desenho esquemático ilustrando o mecanismo de movimentação dos flagelos das bactérias. Basicamente, o processo ocorre devido a um fluxo de prótons que atravessa a membrana interna da bactéria acumulando-se no espaço intermembranoso. A energia para o movimento do flagelo deriva da cadeia transportadora de elétrons. O fluxo reverso de prótons, em vez de produzir ATP como nas mitocôndrias, aciona o flagelo, que chega a 100 rotações por segundo.

bactérias, dá-se o deslizamento dos monômeros protéicos, e a cauda se encurta e alarga, ficando com 35 × 25 nm (Fig. 7.9).

As bactérias (células procariontes) deslocam-se devido ao movimento de seus flagelos

Os flagelos bacterianos são muito diferentes dos flagelos das células eucariontes, e consistem basicamente em um tubo formado por uma única proteína cujos monômeros se dispõem em espiral. Esse tubo se insere em uma peça curva que se prende às duas membranas da bactéria, por intermédio das estruturas ilustradas na Fig. 7.10. Na extremidade destas estruturas, olhando para o interior da bactéria, existe um rotor que forma um pequeno motor impulsionado por um fluxo retrógrado de prótons. Estes prótons são acumulados no espaço intermembranoso por mecanismo parecido com o que ocorre nas membranas internas das mitocôndrias. A movimentação desses flagelos é responsável pelo deslocamento em direção determinada, induzido por substâncias que atraem ou repelem as bactérias, fenômeno este chamado de **quimiotactismo** (*quimio*, químico, e *tactismo*, disposição, arranjo).

A maioria dos movimentos celulares é devida ao deslizamento de estruturas macromoleculares umas sobre as outras

O mecanismo mais difundido nas células eucariontes é devido ao deslizamento de dois tipos de fibrilas (uma contendo actina e a outra miosina) uma sobre a outra. Porém, os movimentos dos cílios e flagelos e o transporte intracelular de partículas citoplasmáticas são devidos ao deslizamento das macromoléculas de tubulina, que constituem os **microtúbulos**. No decorrer dos deslizamentos citados, a estrutura quaternária das fibrilas e microtúbulos é mantida e o deslizamento se dá graças a forças que ocorrem em pontes que se estabelecem nessas estruturas.

Embora os microfilamentos de actina participem ativamente na movimentação celular, eles têm também funções estruturais. É o caso dos filamentos de actina dos microvilos. Quando os microfilamentos são despolimerizados (pela ação de altas pressões, por exemplo), os microvilos desaparecem, reaparecendo quando cessa a pressão e a actina se repolimeriza, reconstituindo os microfilamentos.

A célula muscular estriada é altamente especializada na transformação de energia química em energia mecânica

A célula muscular estriada, por ser especializada e apresentar um sistema de organelas altamente diferenciado, no sentido de produzir movimento, foi o primeiro sistema analisado em profundidade. É, sem dúvida, o mais bem estudado e dele se conhecem as bases moleculares que explicam o que ocorre durante a contração.

Na vida embrionária, várias células musculares precursoras se fundem, formando sincícios multinucleados que se alongam, originando as **fibras musculares estriadas esqueléticas**. Estas fibras agrupam-se em feixes cujas extremidades se prendem a tendões inseridos nos ossos (Fig. 7.11A). A análise destas fibras ao microscópio óptico mostra que elas contêm um feixe intracitoplasmático de delgadas estruturas cilíndricas — as **miofibrilas** (Fig. 7.11B). Cada miofibrila apresenta alternadamente faixas claras ou **bandas I**, e faixas escuras ou **bandas A**.

O sarcômero é a unidade funcional das fibras musculares estriadas

O estudo das miofibrilas ao microscópio eletrônico revela que elas são formadas por unidades que se repetem: os **sarcômeros**. Cada sarcômero, por sua vez, é limitado por duas estrias finas e elétron-densas: as **estrias Z**. Sarcômero, portanto, é a porção da miofibrila limitada por duas estrias Z consecutivas, sendo formado por uma banda A e dois segmentos da banda I cortada ao meio pela estria Z (Fig. 7.11**C**).

A análise mais fina, ao microscópio eletrônico, revelou que o sarcômero se compõe basicamente de dois tipos de filamentos (Fig. 7.11**D**). Um deles é **fino**, insere-se nas estrias Z graças à participação de uma proteína, a **α-actinina**, e dirige-se medialmente, não atingindo, porém, o centro do sarcômero. O filamento fino é constituído sobretudo por monômeros globosos de uma proteína chamada **actina.** Esses monômeros se polimerizam em cadeias que se enrolam em dupla hélice (Fig. 7.12) à qual se

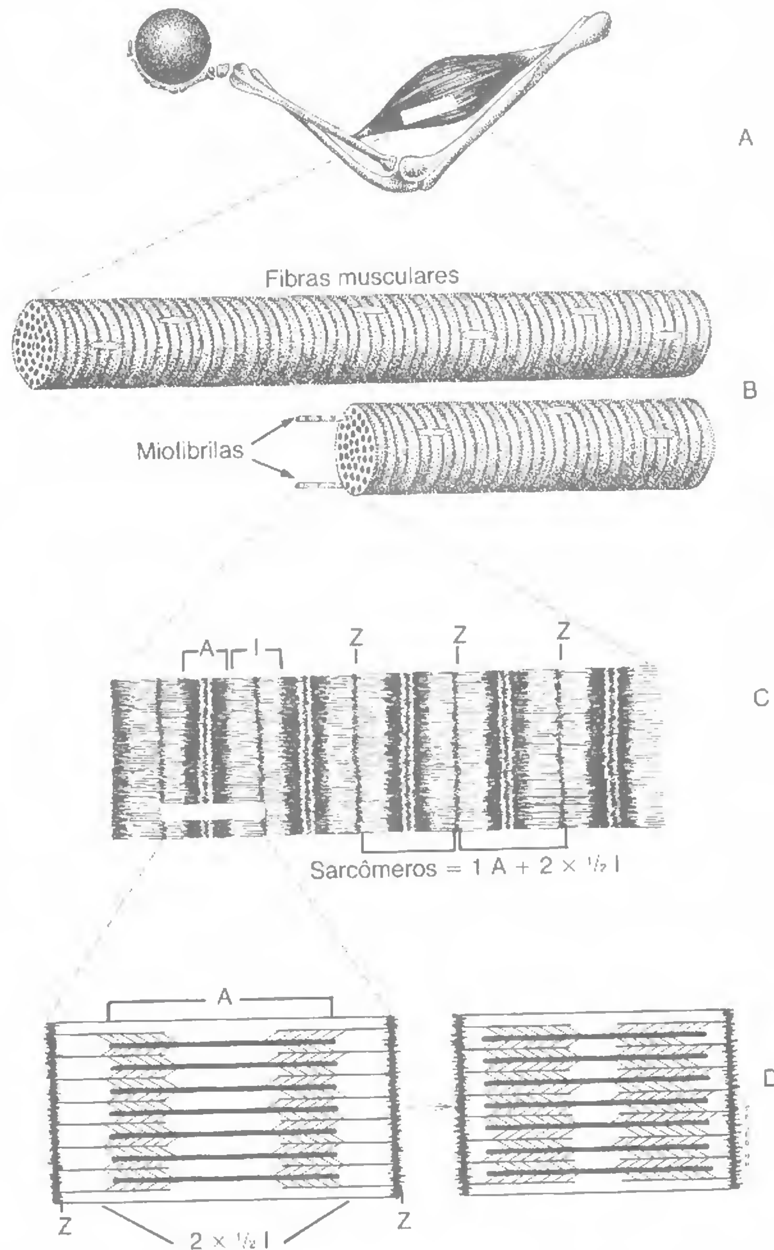


Fig. 7.11 Desenho ilustrando a estrutura do tecido muscular estriado esquelético e o mecanismo de contração proposto por Huxley. O músculo (**A**) é formado por feixes de fibras musculares. Cada fibra é um sincício multinucleado contendo miofibrilas (**B**). Cada miofibrila é formada por unidades que se repetem, os sarcômeros (**C**), limitados lateralmente pelas estrias Z. Em (**D**), a ultra-estrutura de cada sarcômero mostrando os filamentos finos de actina que imbricam com os filamentos grossos de miosina. Os filamentos grossos formam uma banda escura, a banda A. De cada lado da banda A, o desenho mostra uma semibanda I, clara, e a estria Z. À **esquerda**, sarcômero de músculo distendido. À **direita**, sarcômero de músculo contraído. Dá-se a contração devido ao deslizamento dos filamentos finos e grossos. Observem-se as pontes que se estabelecem entre os filamentos.

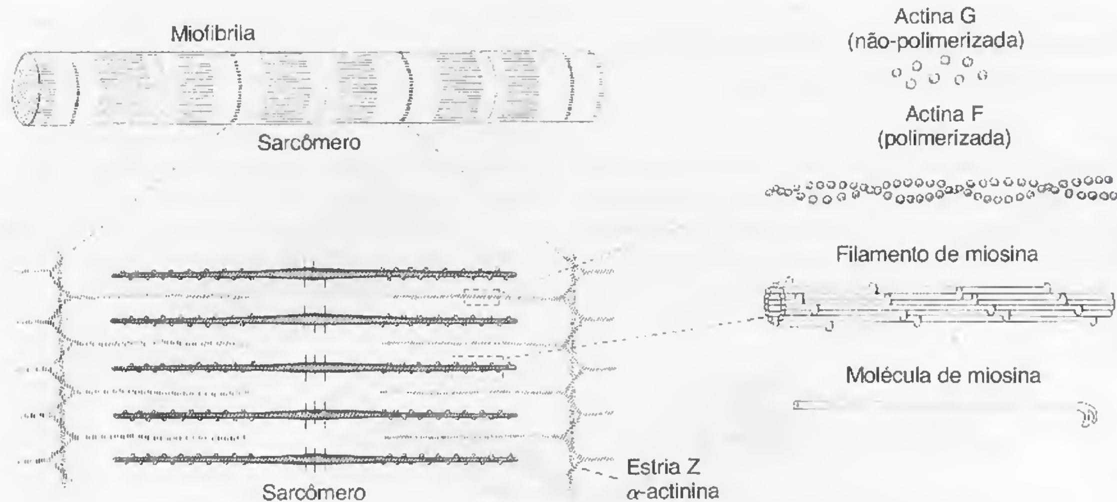


Fig. 7.12 Desenho ilustrando a disposição e a estrutura dos filamentos finos (microfilamentos de actina) e grossos (filamentos de miosina) no sarcômero. O desenho mostra, também, que a estria Z contém a proteína α-actinina. À **esquerda**, os componenes do sarcômero. À **direita**, a estrutura molecular desses componentes.

associam as proteínas **tropomiosina** e **troponina** (Fig. 7.13). Em determinadas circunstâncias, a actina se despolimeriza, apresentando-se sob a forma de moléculas globosas isoladas (actina G). Quando estas moléculas estão polimerizadas, formando microfilamentos, recebem o nome de actina F (Fig. 7.12). Cada monômero de actina tem um *locus* químico que reage com a miosina. As proteínas actina, tropomiosina e troponina se associam como ilustrado na Fig. 7.13.

Os filamentos **grossos** situados no centro do sarcômero sem atingirem lateralmente as estrias Z são constituídos por feixes de moléculas protéicas fibrilares de **miosina**. Cada molécula de miosina é constituída por dois longos polipeptídeos enrolados que assumem a forma de um bastão longo com duas cabeças globulares em uma das suas extremidades. O filamento espesso de miosina é formado pela associação de centenas de moléculas dispostas em várias alturas, formando um feixe do qual as cabeças da miosina fazem saliência (Fig. 7.12). Cada um destes espessamentos ou cabeças de miosina contém uma região que se combina especificamente com a actina (Fig. 7.14).

O deslizamento dos filamentos de actina e miosina encurta os sarcômeros e causa a contração muscular

A contração muscular ocorre graças ao deslizamento dos filamentos de actina sobre os de miosina para dentro do sarcômero, com o conseqüente encurtamento da distância entre as estrias Z. A força motriz para este movimento vem das ligações entre a actina e os espessamentos encurvados da miosina, que periodicamente se dobram gerando um deslocamento lateral, seguido por uma ruptura e posterior recons-

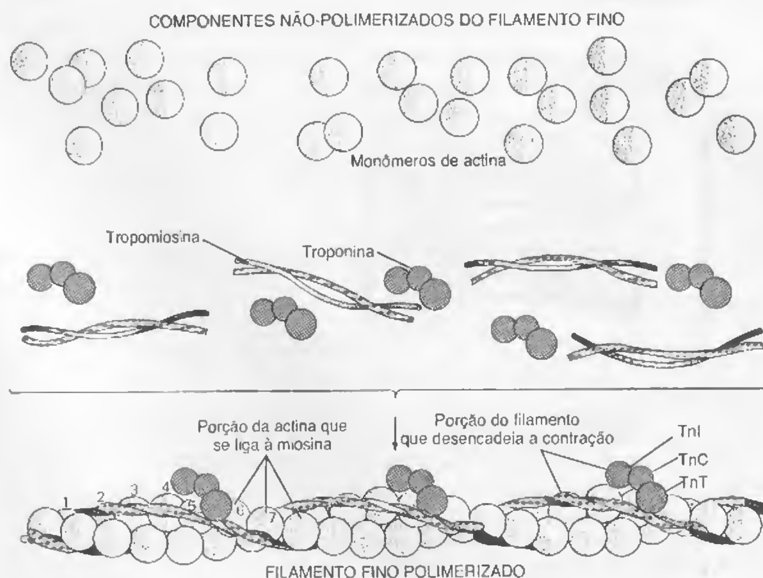


Fig. 7.13 Figura esquemática que ilustra como as proteínas **actina**, **tropomiosina** e **troponina** se associam para formar os filamentos finos. Na parte de cima do desenho, os componentes livres e, embaixo, polimerizados nos filamentos. Observe que cada molécula de tropomiosina se prende intimamente a sete monômeros da actina. A troponina liga a actina à tropomiosina. Quando aumenta a concentração de íons Ca^{2+}, a troponina se deforma e afasta a molécula de tropomiosina da de miosina. A troponina é constituída por três subunidades denominadas de TnI, TnC e TnT.

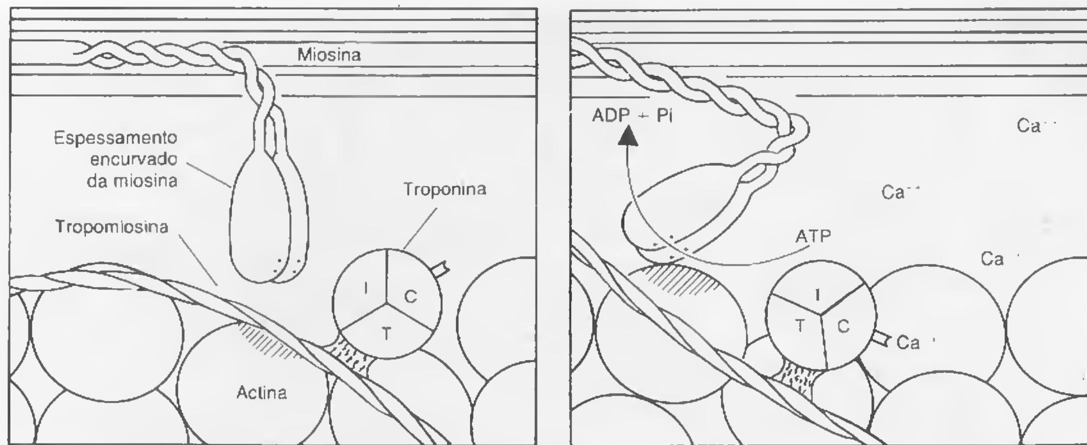


Fig. 7.14 Esquema ilustrando o processo molecular da contração muscular. O Ca^{++} liberado do retículo endoplasmático liso prende-se à troponina que modifica sua forma, deslocando a tropomiosina e expondo as áreas receptoras da actina (em riscado), que, então, se ligam aos espessamentos encurvados da miosina. Em uma segunda etapa, ocorre hidrólise de ATP a ADP, com liberação da energia utilizada para dobrar a molécula de miosina. O processo de dobramento da molécula da miosina, que gera o deslizamento da actina sobre a miosina, se processa em duas regiões da molécula. Conseqüentemente, os filamentos finos (actina) deslizam sobre os grossos (miosina), promovendo o encurtamento dos sarcômeros e a contração muscular. (Reproduzido com permissão de Ganong, W. F. *Review of Medical Physiol.* 14th ed., Lange Publications 1989.)

tituição da ligação (Fig. 7.14). Desta maneira, os filamentos de actina se deslocam em relação aos de miosina, de modo análogo ao que ocorre quando uma taturana se desloca ao longo de um ramo de árvore. Os pés da taturana representariam os espessamentos da miosina que se dobram durante a contração muscular (Fig. 7.14). Comparando-se o músculo contraído com o distendido, observa-se que, no primeiro, os filamentos finos (microfilamentos de actina) se tornam menos visíveis devido ao seu deslizamento por entre os filamentos grossos (Figs. 7.11, 7.15 e 7.16).



Fig. 7.15 Eletromiografia de músculo estriado esquelético em estado de distensão. No centro, escurecida, a estria Z ladeada pelos filamentos finos e, mais lateralmente, pelos grossos. Em R, o retículo liso, onde é acumulado o cálcio no músculo em repouso. 100.000 ×.

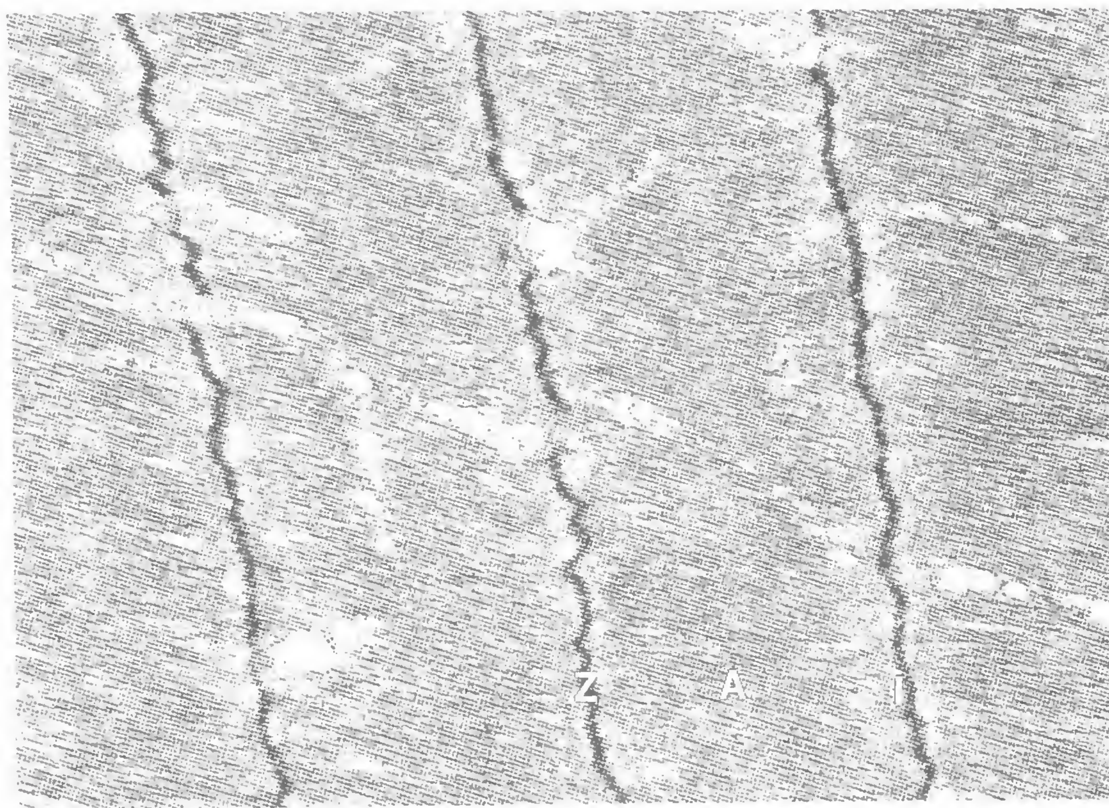


Fig. 7.16 Eletromicrografia mostrando a ultra-estrutura de músculo estriado esquelético em estado de contração. Os filamentos finos deslizaram por entre os filamentos grossos, desaparecendo a zona clara (banda I) que ladeava as estrias Z. 45.000 ×.

A liberação de íons Ca^{2+} do retículo endoplasmático liso transmite para dentro da fibra muscular o estímulo contrátil recebido pela membrana

Como ocorre o desencadeamento da contração muscular? No músculo em repouso, a tropomiosina encontra-se em íntimo contato com a actina, cobrindo esta molécula e impedindo o contato dos espessamentos (pontes) da miosina com a actina. Quando o músculo é estimulado, o aumento de permeabilidade induzido pelo estímulo na membrana celular se transmite ao retículo endoplasmático liso, que libera íons cálcio, contidos no seu interior, para o citoplasma. Esses íons agem sobre a troponina promovendo sua deformação molecular, o que causa a separação entre a tropomiosina e a actina. Este movimento molecular expõe os grupamentos da actina que reagem com as cabeças da miosina, estabelecendo-se assim pontes entre estes dois filamentos (Fig. 7.14). Na etapa seguinte, o deslizamento entre a actina e a miosina ocorre devido ao deslocamento lateral das pontes, graças à energia proveniente de ATP.

Admite-se que, nas fibras musculares estriadas, tanto esqueléticas como cardíacas, a contração se dá pelo processo descrito. No caso do músculo liso, os filamentos grossos formados por feixes de miosina não são facilmente visíveis. Trabalhos recentes, porém, demonstram a sua presença quando o tecido é fixado em estado de contração.

Chama a atenção, nos músculos, o estreito contato entre as miofibrilas e as mitocôndrias. Trata-se, evidentemente, de uma das características associações entre organelas que tanto contribuem para uma maior eficiência celular. Neste caso, as mitocôndrias produzem ATP, molécula que armazena, sob a forma de ligações químicas, a energia que será usada na contração, sendo claramente vantajoso que as mitocôndrias estejam próximas das miofibrilas.

Outros exemplos da interação de actina e miosina

A seguir serão citados outros exemplos da interação actina-miosina, proteínas muito difundidas nos vários tipos celulares. A actina apresenta alta diversidade funcional, que resulta da sua capacidade de interagir com várias proteínas presentes na maioria das células, chamadas coletivamente de **proteínas que se ligam à actina**. Ao se ligarem à actina, essas proteínas desempenham papéis diferentes: por exemplo, a **filamina** liga filamentos de actina entre si, a **espectrina** prende a actina à membrana plasmática, a **fimbrina** forma feixes de actina e a **minimiosina** patrocina o deslizamento de partículas sobre moléculas de actina. Existem vários outros tipos de proteínas que se associam à actina, além dessas proteínas citadas como exemplos. No organismo dos mamíferos existem vários tipos de células não musculares que apresentam acentuada capacidade de contração; a seguir serão mencionados três exemplos: 1) as **células mioepiteliais**, células estreladas que abraçam as porções secretoras de algumas glândulas exócrinas, como as glândulas mamárias, sa-

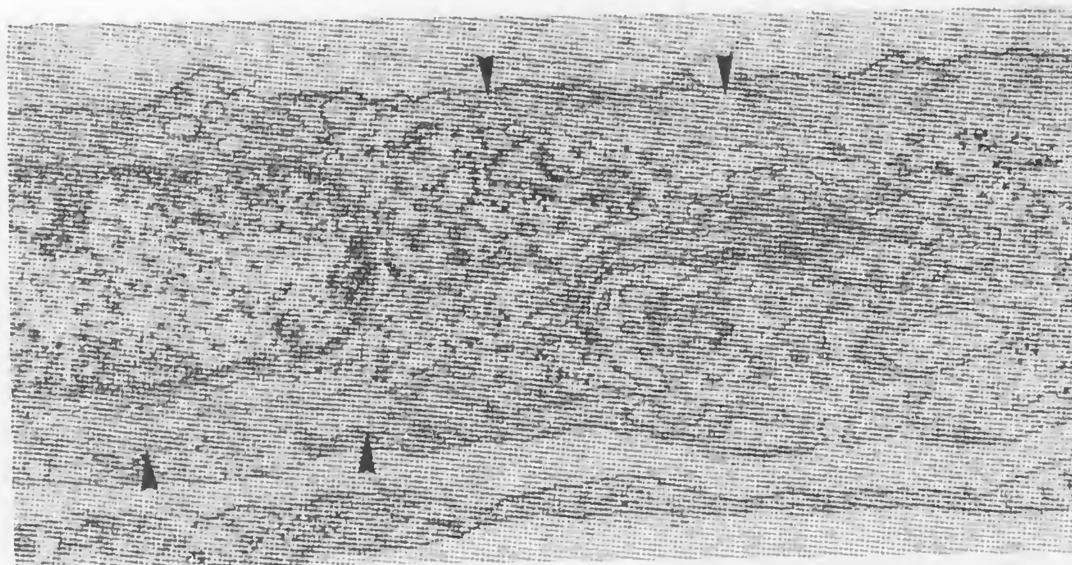


Fig. 7.17 Eletromicrografia de célula mióide da parede de túbulo seminífero do testículo. Observe a abundância de microfilamentos intracitoplasmáticos (cabeças de seta). 43.000 ×.

livares e sudoríparas; 2) as **células mióides** (Fig. 7.17), que envolvem os túbulos seminíferos do testículo; e 3) as **células endoteliais** (Fig. 7.18) dos capilares sangüíneos. Esses três tipos celulares apresentam muitos microfilamentos citoplasmáticos de actina, que, juntos, com a miosina, são responsáveis pela atividade contrátil observada.

Citocinese. A separação das células-filhas no fim da mitose (também chamada de **citodiérese**) ocorre também devido à interação de actina e miosina, e o seu mecanismo está esquematizado no Cap. 8.

Microvilos. O pólo apical das células epiteliais do revestimento intestinal e dos túbulos contorcidos renais apresenta numero-

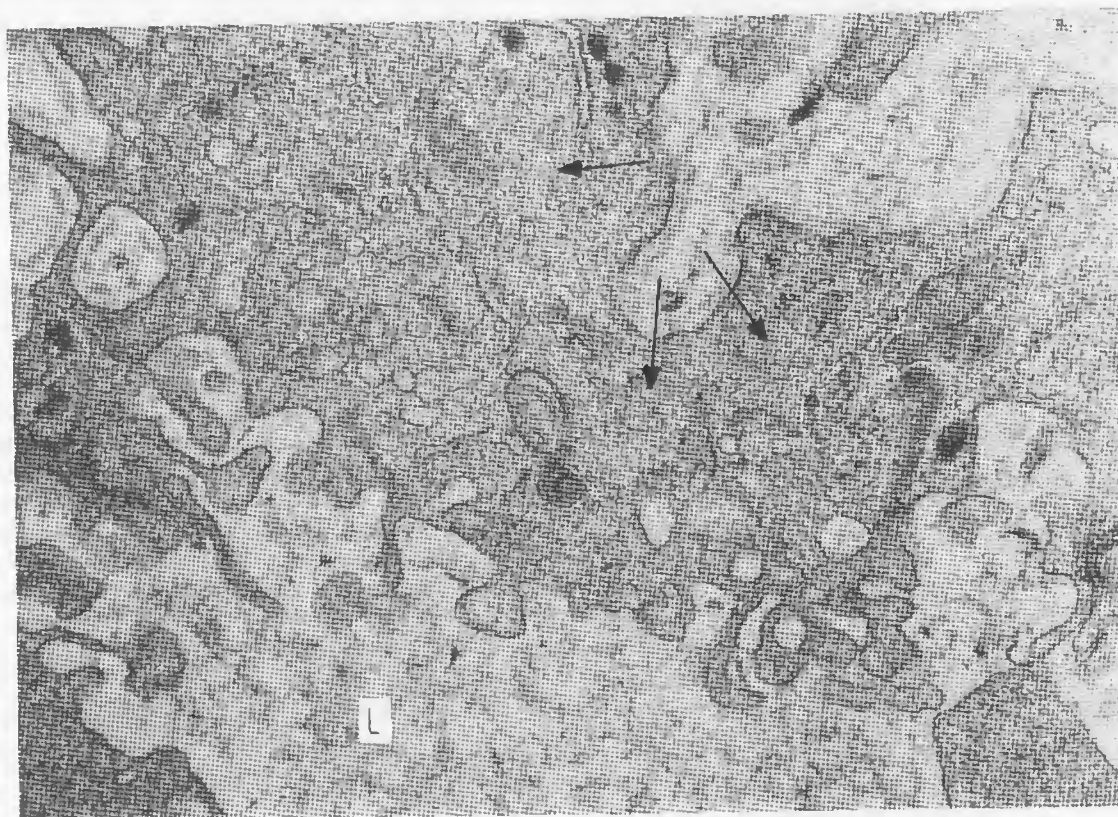


Fig. 7.18 Eletromicrografia de corte de parede de vaso capilar humano. Notar a presença de feixes de microfilamentos de actina no citoplasma das células endoteliais (setas). Em L, a luz do vaso. Esses microfilamentos participam da contração que se observa nestas células. 45.000 ×.

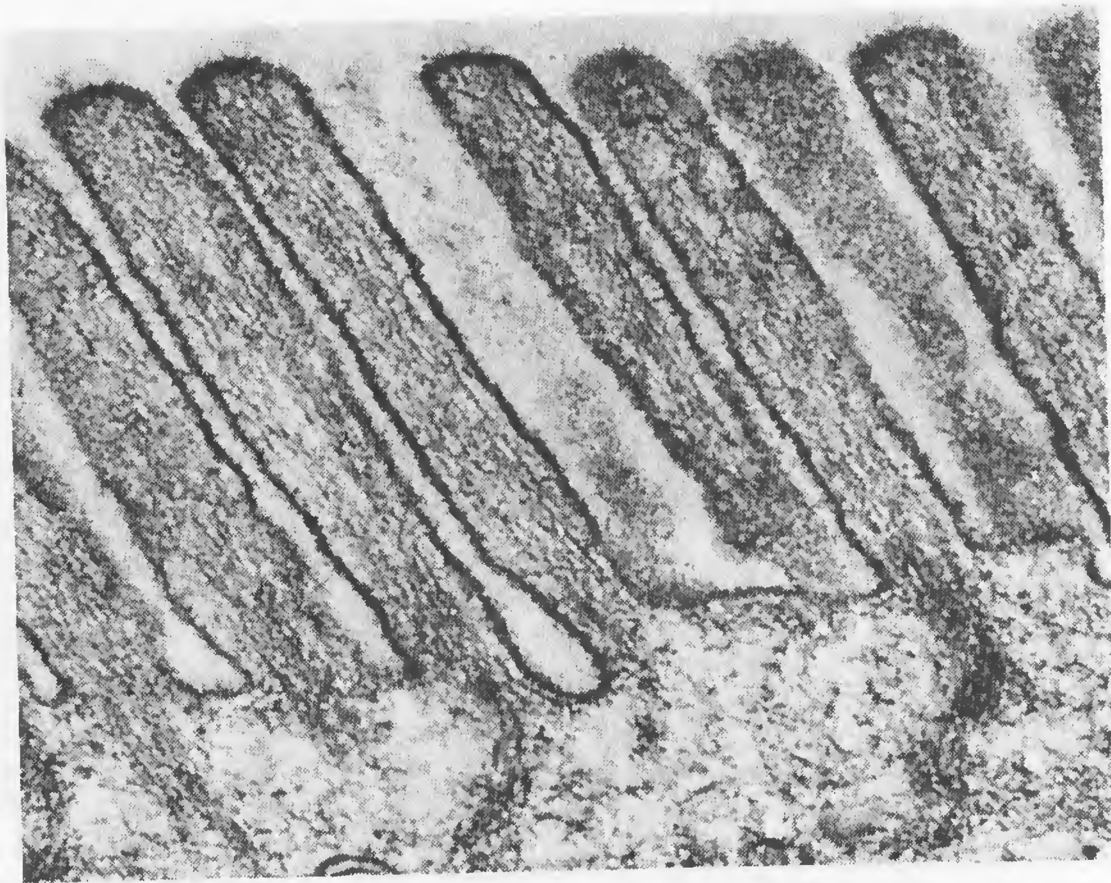


Fig. 7.19 Micrografia eletrônica do pólo apical de uma célula do intestino delgado. Observe a presença de microfilamentos dispostos paralelamente nos microvilos e, também, no citoplasma subjacente. Essa célula é especializada para a absorção de nutrientes, e os microvilos têm a função de aumentar a área absorvente. 15.000 ×.

sos microvilos (Fig. 7.19). O estudo desses microvilos por microscopia eletrônica e imunocitoquímica revelou a presença de actina, miosina e α-actinina, proteínas relacionadas com a contração mas que, nos microvilos, têm exclusivamente um papel de sustentação, mantendo a forma alongada do microvilo. Os microvilos contêm no seu interior ao redor de 40 microfilamentos de actina. Estes se prendem em espessamentos que ocorrem na extremidade dos microvilos (Fig. 7.20) e que se ligam entre si e com a membrana plasmática por meio de várias proteínas (Fig. 7.21).

Movimentos morfogenéticos. São os movimentos que ocorrem nos tecidos durante o desenvolvimento embrionário. Sabe-se, por exemplo, que os esboços das glândulas salivares e do pâncreas formam-se graças a invaginações do epitélio bucal e intestinal, respectivamente. Diversos estudos demonstraram a presença de microfilamentos, formando uma espécie de cintura em torno do pólo apical das células prismáticas dos epitélios que se invaginam (Fig. 7.22). O deslizamento destes filamentos entre si promove uma constrição do ápice das células, dando-lhes a forma de um cone truncado. Em conseqüência, a folha de células epiteliais tende a afundar no mesênquima subjacente. Esta invaginação do epitélio pode ser reproduzida *in vitro*, bastando transplantar para um meio de cultura o esboço glandular retirado do embrião em idade adequada. Adicionando-se citocalasina a este sistema, observa-se que, ao mesmo tempo que desaparecem os microfilamentos de actina, cessa a invaginação epitelial. Após a remoção da citocalasina do meio, reparecem os microfilamentos e o sistema reassume o movimento de invaginação. É muito provável, portanto, que aqui esteja funcionando um sistema de deslize entre microfilamentos, análogo ao visto na citocinese.

Movimento amebóide. Este tipo de movimento está presente nas células livres como amebas, macrófagos, leucócitos e fibroblastos. Ainda não existe uma explicação completa das bases moleculares do movimento amebóide. Ele se realiza através da extensão, pela célula, de um prolongamento da camada cortical do citoplasma muito rica em actina. Esse prolongamento é denominado **pseudópodo**, e, ao se fixar num substrato, parece puxar o resto da célula em sua direção. Do movimento amebóide participam actina, miosina e outras proteínas, sendo a energia fornecida por ATP. A Fig. 7.23 mostra, por imunofluorescência, a distribuição das proteínas actina e tropomiosina no citoplasma de fibroblastos, ambas participantes da movimentação destas células.

Os movimentos dos cílios e flagelos são promovidos por microtúbulos

Os **cílios** são estruturas com aspecto de pequenos pêlos, com 0,25 μm de diâmetro, constituídos por um feixe de microtúbulos dispostos paralelamente e envoltos por uma membrana (Fig. 7.24).

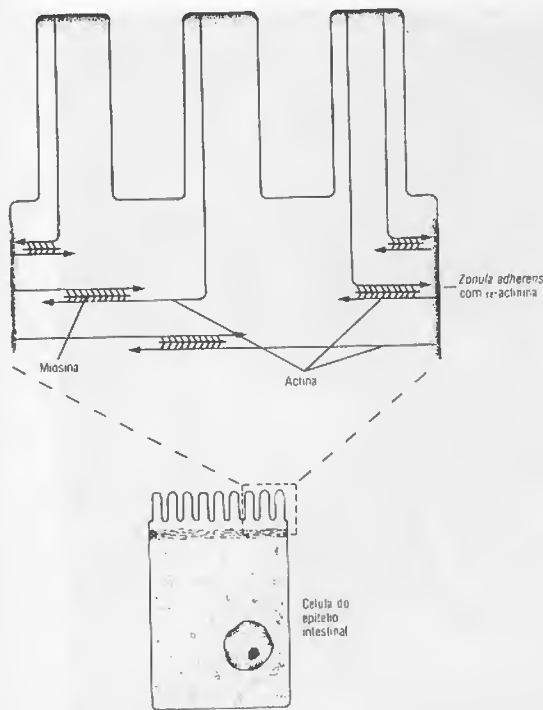


Fig. 7.20 Esquema ilustrando o modelo que se admite para a região dos microvilos. Filamentos finos de actina se inserem na extremidade dos vilos e lateralmente na *zonula adherens*. Filamentos grossos de miosina formariam pontes com os filamentos de actina.

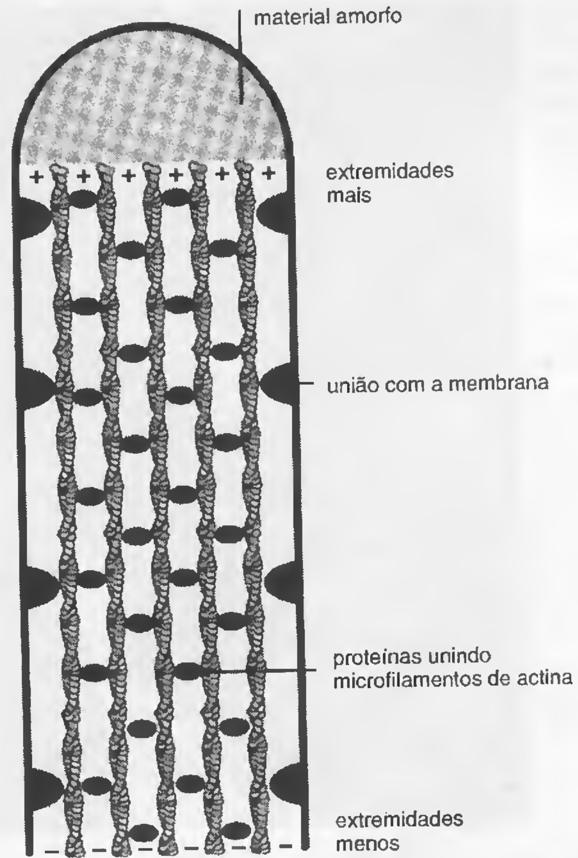


Fig. 7.21 Desenho mostrando o papel estrutural exercido pelos microfilamentos de actina e proteínas associadas na manutenção da forma dos microvilos. Essas proteínas prendem os microfilamentos uns aos outros e à membrana plasmática. No ápice do microvilo existe um material protéico que fixa os microfilamentos, contribuindo para a estabilidade do conjunto.

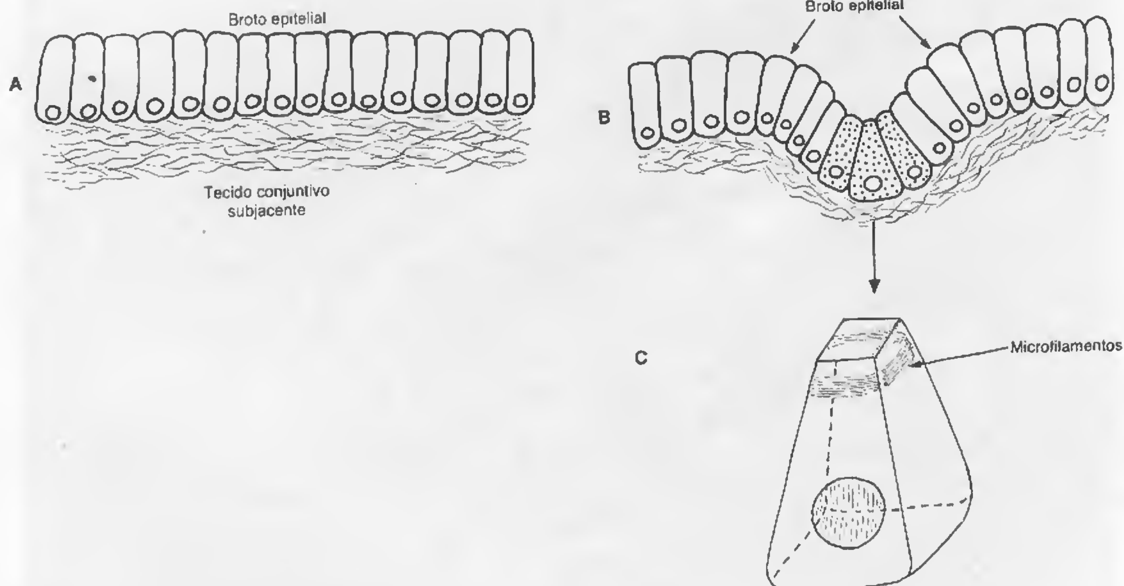


Fig. 7.22 Desenho ilustrando a invaginação do epitélio bucal (**A**) durante a fase inicial da morfogênese das glândulas salivares. As células centrais do broto epitelial (**B**) têm forma de pirâmide truncada devido à constrição de seu ápice por um colar interno de microfilamentos (**C**). Segundo estudos de N. K. Wessels e cols. *Science, 171*:135, 1971.

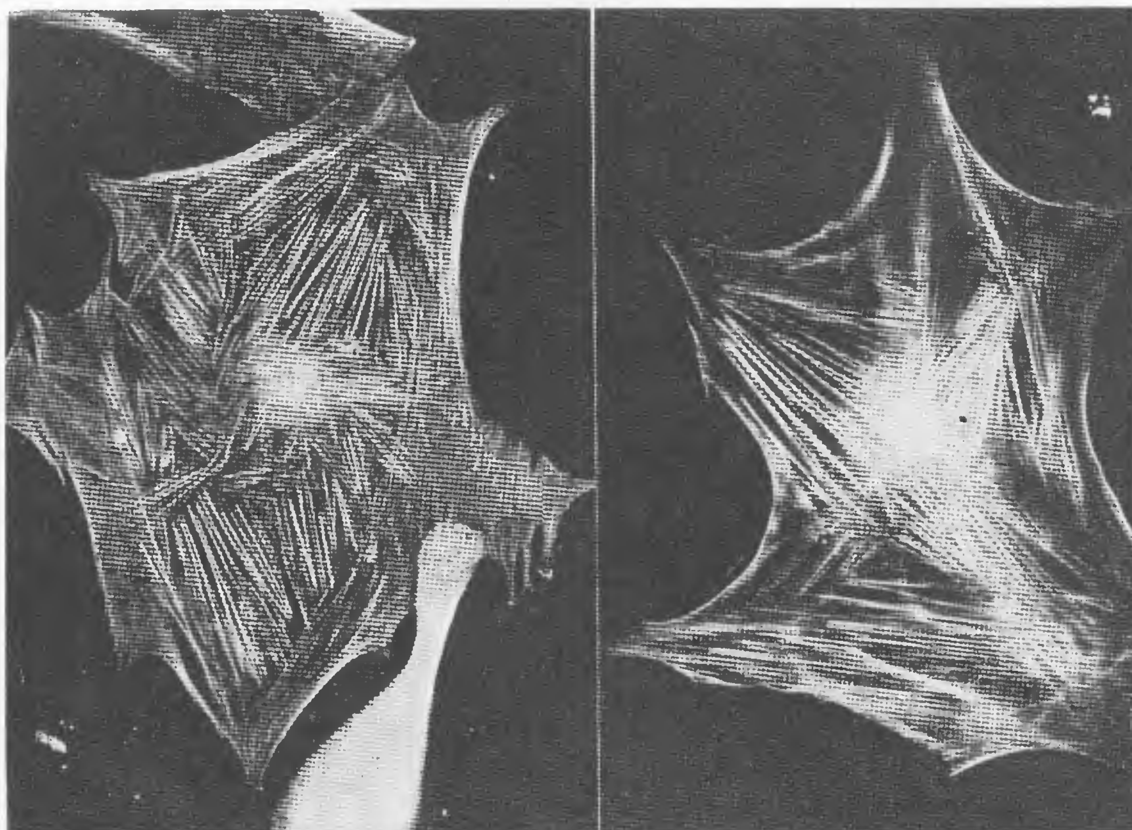


Fig. 7.23 Fotomicrografia de imunofluorescência obtida com o emprego de anticorpos antiactina (**à esquerda**) e antitropomiosina (**à direita**). As figuras mostram a presença dessas proteínas em fibras intracitoplasmáticas de fibroblastos de pele humana. A tropomiosina é uma proteína que se encontra associada à actina nas células. De Lazaridas, E. J. *Cell Biology*, 65:549, 1975. (Reprodução autorizada.)

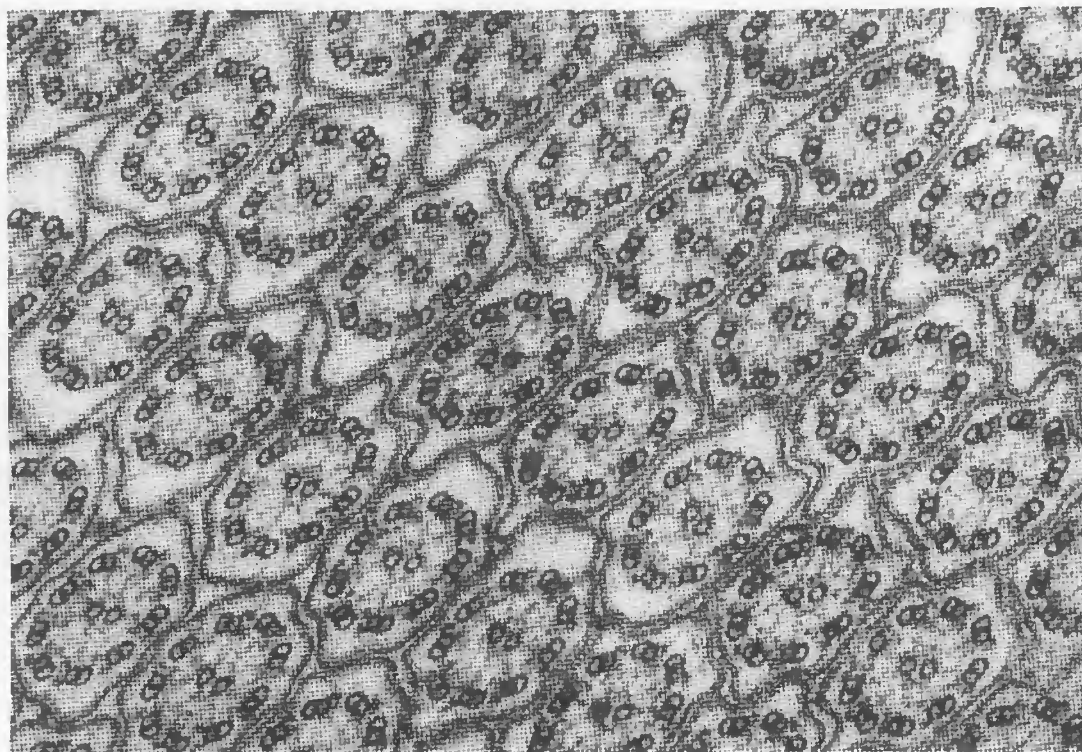


Fig. 7.24 Eletromicrografia de corte transversal de cílios. Observe-se a membrana plasmática envolvente com a sua disposição de unidade de membrana. Dentro de cada cílio, 9 pares de microtúbulos fundidos e um par central não-fundido. 84.000 ×.

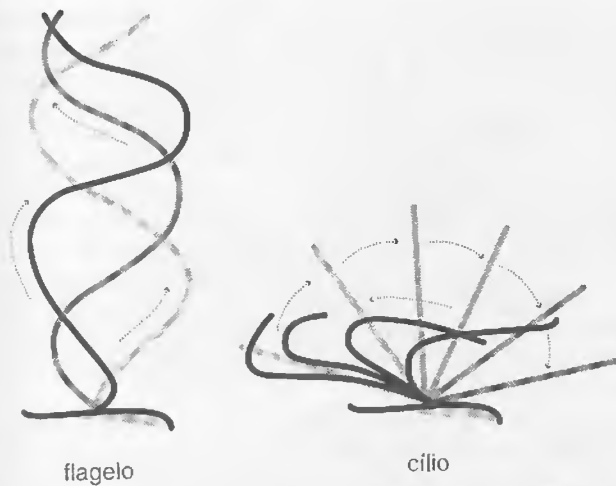


Fig. 7.25 Desenhos mostrando o movimento dos flagelos (**A**) e cílios (**B**). O flagelo se movimenta por uma contração que se inicia na base e se transmite ao longo do flagelo. Na parte ativa do movimento ciliar, que movimenta partículas ou a própria célula, o cílio permanece rígido (esquerda para a direita, no desenho). Em seguida, o cílio se torna flexível e retorna à posição inicial, para iniciar novo ciclo. Assim, nas células fixas, o batimento ciliar impulsiona partículas numa direção determinada (setas superiores). Nas células livres, o batimento ciliar movimenta a célula.

Os cílios são curtos, múltiplos e, nos epitélios, situam-se sempre na superfície apical das células. Os **flagelos** são geralmente únicos e longos e, no corpo humano, encontrados apenas nos espermatozóides.

As células ciliares, presentes no organismo humano na árvore respiratória e no oviduto, encontram-se associadas a células que secretam muco e têm como função o transporte unidirecional de uma camada delgada de muco que reveste a superfície interna dessas estruturas tubulares. Dessa maneira, a poeira que atinge a árvore respiratória é captada pelo muco e transportada para a cavidade bucal, enquanto, no oviduto, ocorre um fluxo de muco para o útero, o que facilita o transporte dos óvulos.

O movimento flagelar dos espermatozóides ocorre por um abalo tipo vaivém, que se inicia na base do flagelo, perto do núcleo do espermatozóide. A atividade do flagelo movimenta o espermatozóide para a frente. A Fig. 7.25 ilustra como se processa o movimento ciliar e o movimento flagelar.

Tanto os cílios como os flagelos são feixes de microtúbulos, de regra formados por 9 pares de microtúbulos dispostos em círculo ao redor de um par central. Os microtúbulos dos pares periféricos apresentam-se fundidos uns aos outros, enquanto, no par central, encontram-se separados (Fig. 7.26). Descrevem-se ainda, nos cílios e flagelos, pequenos braços que partem de um dos microtúbulos dos pares periféricos ligando-os ao par vizinho: são formados por uma proteína, a **nexina** (Fig. 7.26). Além desta estrutura, descrevem-se pequenas pontes que unem entre si os pares de microtúbulos periféricos. Sabe-se que os pequenos braços são constituídos por um complexo de vários polipeptídeos atingindo um peso molecular de 400.000 dáltons, com atividade ATPásica, chamado **dineína**. Uma série de experiências, reali-

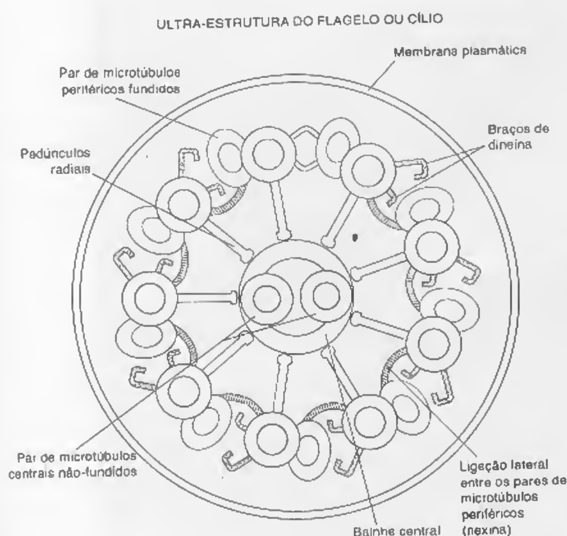


Fig. 7.26 Esquema ilustrando a ultra-estrutura do cílio e do flagelo, vista em corte transversal. Observe os 9 pares fundidos de túbulos periféricos, que se prendem entre si pelos braços de dineína e por ligações laterais (nexina). Os pares periféricos se ligam ao par central (não-fundido) por meio dos filamentos radiais.



Fig. 7.27 Modelo molecular simplificado para explicar os movimentos ciliar e flagelar. Resultados de experimentos realizados em condições normais e após a retirada do material (nexina) que une os microtúbulos dos flagelos dos espermatozóides. Os desenhos de cima mostram que a contração de microtúbulos que não estão fixados leva ao deslizamento de um sobre o outro. Os desenhos inferiores mostram que a fixação dos microtúbulos determina que o movimento seja de encurvamento, e não de deslizamento.

zadas com flagelos isolados de caudas de espermatozóides, demonstraram que os pares de microtúbulos deslizam entre si durante a contração e que a força motriz para este movimento deriva da interação dos braços de dineína com os microtúbulos vizinhos.

Segundo este modelo, a dineína estabelece contato com a tubulina de microtúbulos vizinhos e gera forças que promovem movimento de deslize entre pares de microtúbulos vizinhos, provocando o deslizamento de um par em relação ao outro. Este deslizamento é limitado por proteínas que prendem os pares de microtúbulos uns aos outros. O resultante da ação destas forças contidas leva a um dobramento dos cílios (Fig. 7.27).

Na realidade, do ponto de vista da biologia molecular, o funcionamento dos microtúbulos é complexo, já que diversas proteínas se associam à tubulina. Na cauda dos espermatozóides, já foi verificada a presença de mais de 200 tipos diferentes de proteínas. Tanto os cílios como os flagelos inserem-se em estruturas semelhantes aos centríolos, chamadas **corpúsculos basais** (Fig. 7.28), que apresentam 9 agregados de 3 túbulos periféricos mas sem o par central. Freqüentemente, os corpúsculos basais apresentam prolongamentos dotados de estriações transversais que se dirigem para dentro do citoplasma, formando as chamadas **raízes dos cílios**, que teriam a função de sustentar e ancorar os cílios na célula (Fig. 7.28).

Os corpúsculos basais reproduzem-se (Fig. 7.29) por mecanismos pouco conhecidos. Esse processo em geral inicia-se por aglomeração de substância elétron-densa, o **material pericentriolar**, que pode ocorrer ao lado de centríolos preexistentes ou, então, livre no citoplasma, independentemente de centríolos.

Várias observações sugerem que o ATP fornece energia para os movimentos ciliar e flagelar. Por exemplo, a queda do teor de ATP nos espermatozóides diminui sua motilidade; a adição de ATP a células ciliadas, ou a flagelos isolados e previamente tratados por detergente (para remover a membrana e facilitar a entrada do ATP), promove vigorosos movimentos dos cílios e flagelos. Um exemplo extremo de acúmulo de microtúbulos relacionados com movimento flagelar de espermatozóide é ilustrado na Fig. 7.30. Nas células dos epitélios ciliados, as mitocôndrias dispõem-se principalmente no pólo apical, em situação ideal para fornecerem aos cílios o ATP por elas produzido (Fig. 7.28). Fenômeno análogo ocorre nos espermatozóides dos mamíferos, cujo flagelo é envolto por uma espiral de mitocôndrias na sua porção inicial.

Os cílios e flagelos são estruturas complexas constituídas por numerosas proteínas diferentes, várias das quais são imprescindíveis para sua movimentação. A síndrome de Kartagener, assim denominada em homenagem a seu descobridor, acarreta em seus portadores freqüentes infecções respiratórias, sinusite crônica e esterilidade masculina. As mulheres portadoras da síndrome são férteis. Essa síndrome foi descrita na década de 1930, mas só recentemente suas bases moleculares foram descobertas. O estudo dos espermatozóides de pacientes com a síndrome de Kartagener mostrou que os braços de dineína estão ausentes nos cílios e flagelos, o que impede a movimentação dessas estruturas, impossibilitando o deslocamento dos espermatozóides e o batimento ciliar responsável pela eliminação contínua de poeiras que penetram na árvore respiratória. Recentemente foram

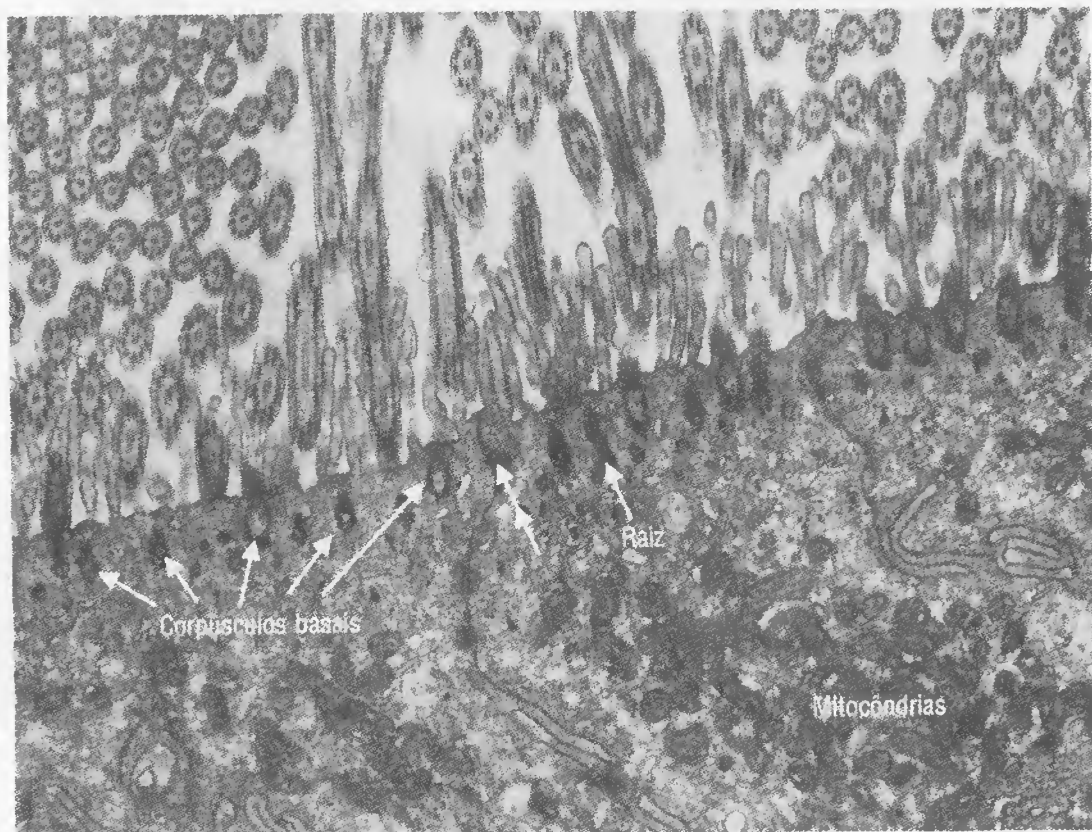


Fig. 7.28 Eletromicrografia da região apical de células ciliadas. Observar os cílios implantados nos corpúsculos basais (seta simples), de onde partem as raízes dos cílios. Note-se o acúmulo de mitocôndrias no ápice destas células. Entre os cílios, observam-se microvilos na superfície das células. Na seta dupla, um complexo juncional. 25.000 ×.

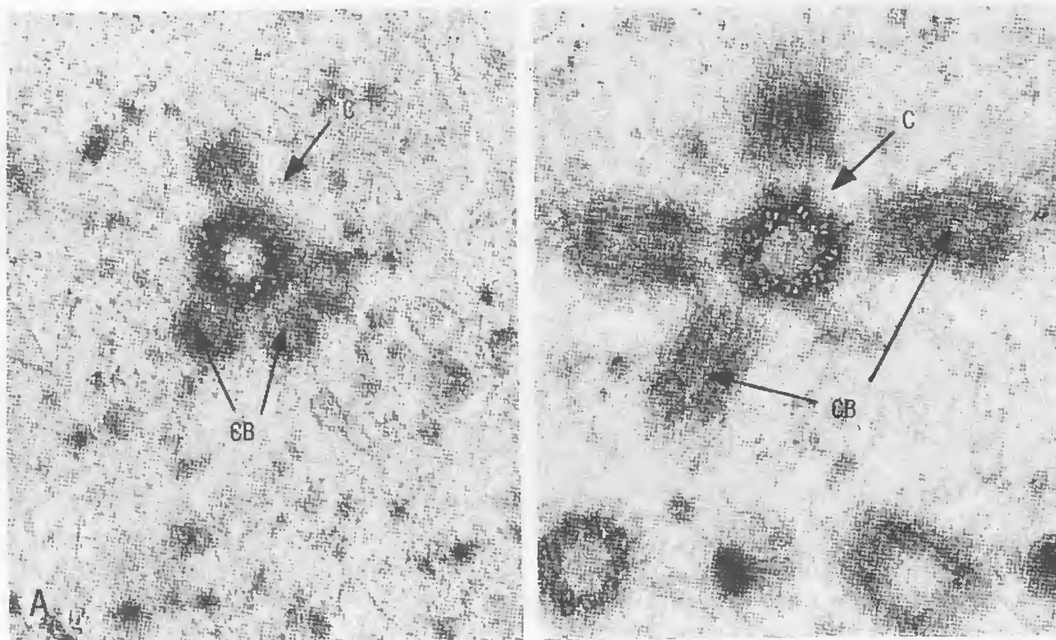


Fig. 7.29 Eletromicrografia mostrando a formação de corpúsculos basais no oviduto de macaca. Quando se injeta hormônio estrógeno em macacas, formam-se, em pouco tempo, muitos cílios na superfície das células epiteliais do oviduto. As figuras ilustram a formação de corpúsculos basais (CB) ao lado de um centríolo preexistente (C). Em **A**, fase inicial de formação e, em **B**, fase mais adiantada. Admite-se que a maior parte dos corpúsculos basais (95%) se forma sem a presença de centríolos preexistentes. (Cortesia de R. G. W. Anderson e R. M. Brenner. *J. Cell Biology*, 50:10, 1971. Reprodução autorizada.)

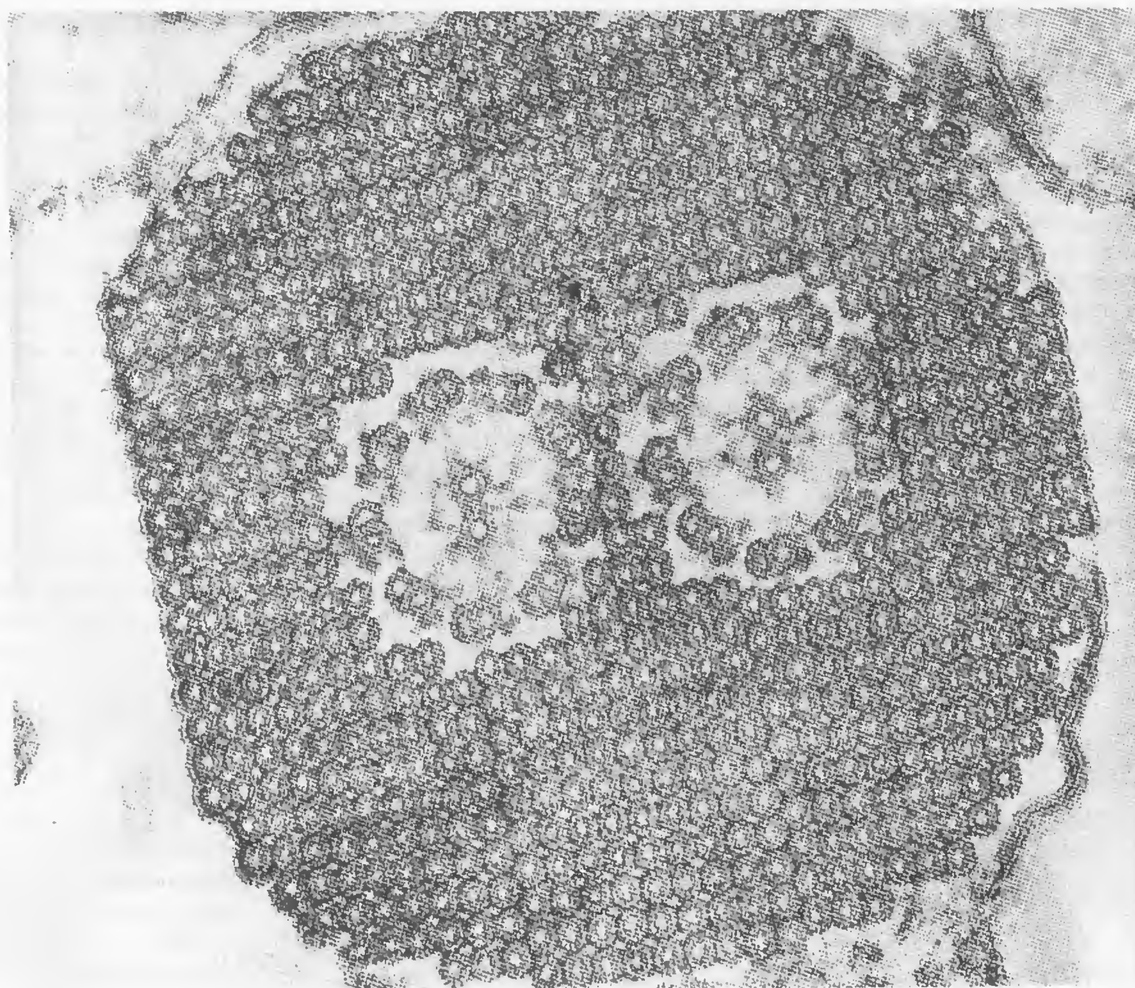


Fig. 7.30 Corte transversal da cauda de espermatozóide do sapo *Racopholus scheligelii arborea* fixado na mistura glutaraldeído-ácido tânico, seguida de tratamento pelo ósmio (coloração negativa). Um par de estruturas semelhantes a flagelos é envolto por aproximadamente 500 microtúbulos. Cada microtúbulo é constituído por 13 subunidades globosas. Cortesia de V. Mizuhira.

descritas outras doenças de sintomatologia semelhante, causadas pela ausência de outras proteínas dos cílios e flagelos que também participam de sua movimentação, criando assim um complexo de enfermidades: **a síndrome dos cílios imóveis**.

Além dos microtúbulos localizados nos cílios e flagelos, existem microtúbulos também no citoplasma, importantes para diversas funções celulares. Estes microtúbulos citoplasmáticos encontram-se em constante reorganização, crescendo em uma extremidade graças à polimerização local dos dímeros de tubulina e diminuindo na outra extremidade graças à despolimerização local. Essas extremidades recebem, respectivamente, a designação de mais e menos (+ e −). Os processos de encurtamento e alongamento dos microtúbulos ocorrem quando existe um desequilíbrio entre a polimerização e a despolimerização de suas extremidades. Os microtúbulos são importantes para alguns processos de mudança de forma celular, transporte intracitoplasmático de partículas e para os movimentos cromossômicos na mitose, como será visto no Cap. 8. A formação de microtúbulos não depende necessariamente da síntese de nova tubulina (cujos dímeros se encontram no citoplasma), e pode ser instantânea, circunstância muito conveniente para as células.

Os microtúbulos e microfilamentos de actina servem de ponto de apoio para a movimentação intracelular de partículas

O estudo dos processos de deslocamento intracitoplasmático de partículas celulares foi facilitado graças à análise de células onde partículas são visíveis e ostensivamente transportadas dentro das células, como nos melanóforos (Fig. 7.31), células que contêm grânulos de melanina. Esses deslocamentos intracitoplasmáticos também foram muito estudados nos prolongamentos dos neurônios ou células nervosas (Fig. 7.32).

Nesses dois modelos, partículas são transportadas em diferentes direções e com velocidades diferentes. O estudo desses e de outros modelos levou à descoberta de que esse processo ocorre graças à participação de vários tipos de complexos protéicos específicos chamados de **proteínas motoras** (Fig. 7.33). Cada proteína motora é constituída por dois tipos de componentes, a saber: os **componentes adaptadores,** que se prendem de um lado especificamente às várias partículas a serem transportadas e, do outro lado, aos segundos componentes que são os **componentes motores.** Estes, por sua vez, se prendem em uma extremidade aos adaptadores e, na outra, aos microtúbulos ou aos filamentos de actina. O componente motor apresenta uma estrutura molecular parecida com a miosina, podendo se ligar à actina ou à tubulina, promovendo o deslizamento do complexo proteína motora-partícula ao longo dessas estruturas. Isto ocorre graças à energia derivada de hidrólise de ATP promovida pela ATPase presente nos componentes motores.

Foram descritos dois tipos de componentes motores, sendo um aqueles que promovem o deslocamento das partículas sobre os microtúbulos na direção mais para menos (+ para −), e que receberam o nome genérico de **dineínas.** O termo **cinesinas** refere-se aos componentes motores que promovem o deslocamento em direção oposta (− para +). A direção e a velocidade do transporte intracelular de partículas dependem da diversidade das proteínas motoras existentes nos vários tipos celulares. Este é mais um exemplo de famílias de proteínas que, graças a peque-

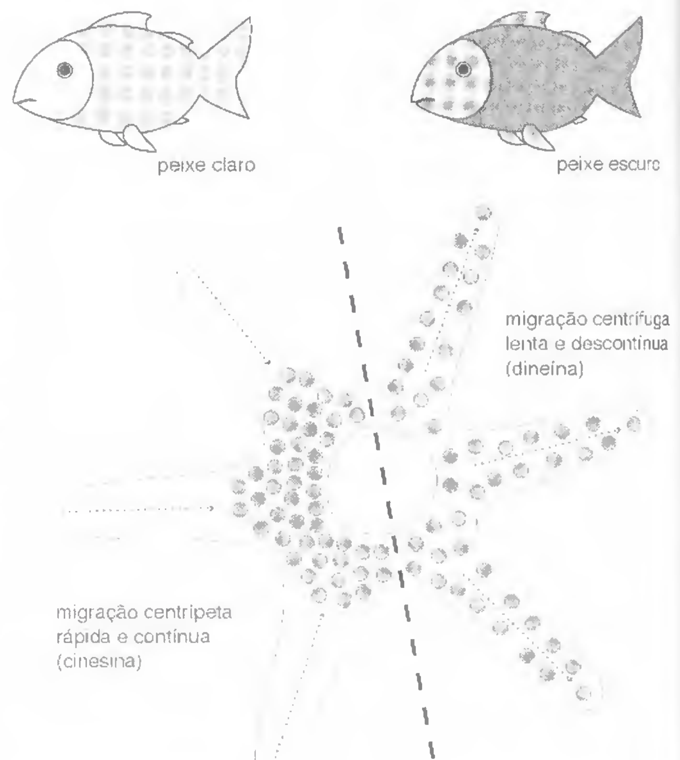


Fig. 7.31 Desenho mostrando transporte intracelular num **melanóforo**, cujos grânulos de melanina se deslocam em direção centrípeta, por estímulo nervoso, ou centrífuga, quando cessa este estímulo. Dessa maneira, os peixes se adaptam à cor ambiental, defendendo-se de seus predadores.



Fig. 7.32 Desenho ilustrando a movimentação intracelular nos **axônios** (prolongamentos dos neurônios), que transportam partículas diversas com velocidades diferentes, nas duas direções.

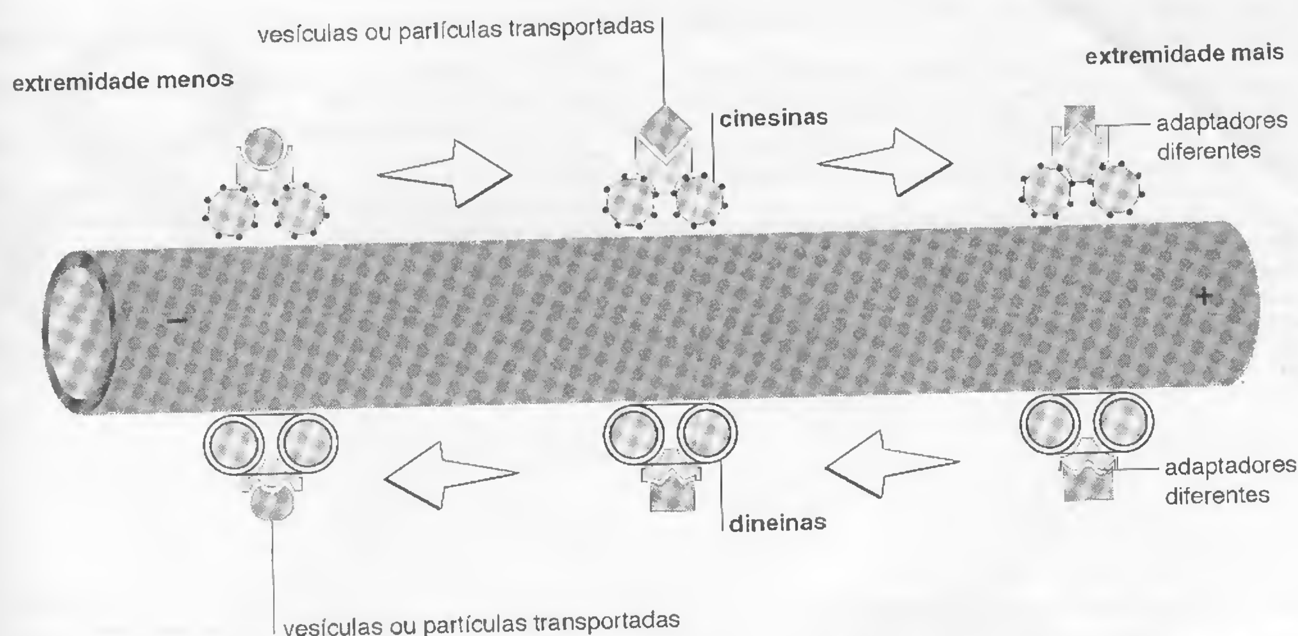


Fig. 7.33 Desenho esquemático mostrando a participação das proteínas motoras **cinesina** e **dineína** na movimentação de partículas citoplasmáticas ao longo de um microtúbulo. A cinesina transporta na direção da extremidade mais (+) e a dineína na direção da extremidade menos (−) do microtúbulo. A variedade de cinesinas, dineínas, proteínas motoras e proteínas adaptadoras possibilita o transporte de partículas e vesículas diversas de um local para outro dentro da célula.

nas modificações estruturais, atendem às necessidades de inúmeros tipos celulares.

As células pigmentares dos vertebrados inferiores, chamadas **cromatóforos,** são um modelo onde o transporte intracelular é muito fácil de visualizar. Entre estas, as que contêm pigmento negro (melanina) são grandes e de fácil observação. Chamam-se **melanóforos** e, em geral, têm forma estrelada e apresentam um núcleo excêntrico. O controle do deslocamento intracelular dos grânulos de pigmento dos cromatóforos é feito, na maioria dos peixes, via sistema nervoso simpático pela liberação de noradrenalina nas terminações nervosas, o que promove a rápida e contínua migração centrípeta de pigmento. A migração do pigmento em direção oposta é um processo muito mais lento e irregular. Esse material é, portanto, muito favorável ao estudo do fenômeno do transporte intracelular. A microscopia eletrônica revelou que os melanóforos possuem um par de centríolos, de onde se irradia grande quantidade de microtúbulos entre os quais estão dispostos os grânulos de pigmento.

O tratamento prévio dessas células com colchicina ou vimblastina leva à despolimerização dos microtúbulos e, ao mesmo tempo, a um bloqueio da migração dos grânulos de pigmento. O frio, que também provoca despolimerização reversível dos microtúbulos nessas células, promove a inibição, também reversível, da migração de pigmento. Estes resultados mostram que os microtúbulos têm papel relevante no transporte dos grânulos.

Extrusão de grânulos de secreção. Em determinada fase do ciclo secretor, os grânulos de secreção são expulsos da célula por um processo de extrusão, também chamado de **exocitose** (*exo*, fora, e *cytos*, célula). Diversos trabalhos vêm demonstrando que a colchicina e a citocalasina inibem, tanto *in vitro* como *in vivo*, a extrusão dos grânulos secretórios de inúmeros tipos de células. Conseqüentemente, admite-se que os microtúbulos e microfilamentos participam da extrusão dos produtos de secreção acumulados em grânulos no interior das células.

A participação dos microtúbulos no processo da extrusão dos grânulos de secreção é ilustrada no diabetes genético do roedor *Acomys cahirinus*, que apresenta deficiência em microtúbulos. Nesses animais, as células produtoras de insulina (células B das ilhotas de Langerhans do pâncreas) sintetizam insulina normalmente, mas a carência de microtúbulos impede a eliminação dos grânulos de secreção, que se acumulam no citoplasma.

Sumário

Filamentos de actina e de miosina, microtúbulos e proteínas motoras são os principais componentes celulares envolvidos nos processos de movimentação.

Os movimentos que acarretam modificações na forma das células (movimento amebóide, contração muscular, citocinese, contração das células mióides) têm a mesma base molecular e resultam da interação de filamentos de actina com filamentos de miosina. Há, todavia, movimentos que são devidos a deslizamentos limitados que ocorrem entre os microtúbulos, como os movimentos ciliares e flagelares. A energia para os movimentos é obtida dos alimentos, sendo daí transferida para ligações químicas na molécula de ATP, que é a fonte imediata de energia para os movimentos celulares.

Bibliografia

ALBERTS, B. *et al. Molecular Biology of the Cell*, 3rd ed. Garland, New York, 1994.

BERSHADSKY, A. D. and VASILIEV, J. M. *Cytoskeleton*. Plenum, 1988.

BRAY, D. *et al. Cell motilitis. Trends Cell Biol.* 3(11). (Volume dedicado à motilidade.) 1993.

COOPER, J. A. and MITCHISON, T. J. (eds.). *Cytoskeleton. Curr. Opin. Cell. Biol.*, 7(1), 1995.

FUCHS, E., and WEBER, K. Intermediate filaments: Structure, dynamics, function, and disease. *Ann. Rev. Biochem., 63:*345, 1994.

HYAMS, J. and LLOYD, C. W. *Microtubules.* Wiley-Liss, 1994.

JACOBSON, K. and WOJCIESZYN, J. The translational mobility of substances within the cytoplasmic matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, *81:*6747, 1984.

JUNQUEIRA, L. C. U., RAKER, E. and PORTER, K. R. Studies in pigment migration in the melanophores of the teleost. *Fundulus heteroclitus* (L.). *Arch. Histol. Jap., 36:*339, 1974.

KELLOG, D. R., MORTIZ, M. and ALBERTS, B. M. The 1944 centrosome and cellular organization. *Ann. Rev. Biochem., 63:*639, 1994.

LACKIE, J. M. *Cell Movement and Cell Behavior.* Allen and Unwin, 1985.

LUNA, E. J. and HITT, A. L. Cytoskeleton-plasma membrane interactions. *Science, 258:*955, 1992.

MITCHISON, T. and KIRSCHNER, M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature, 31:*237, 1984.

MOOSEKAR, M. S. Organization, chemistry, and assembly of the citoskeletal apparatus of the intestinal brush border. *Ann. Rev. Cell. Biol., 1:*209, 1985.

SATIR, P. How cilia move. *Sci., 231:*45, 1974.

SCHNAPP, B. J. Molecular motors: Two heads are better than one. *Nature, 373:*655, 1995.

SPUDICH, J. A. How molecular motors work. *Nature, 372:*515, 1994.

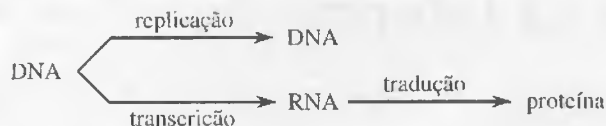
TRAUB, P. *Intermediate Filaments.* Springer-Verlag, 1985.

8 Armazenamento da Informação Genética

Roteiro

- *Replicação: síntese de DNA sobre um modelo também de DNA.*
- *Transcrição: síntese de RNA sobre um modelo de DNA.*
- *Tradução: síntese de molécula protéica nos ribosomas dirigida por mRNA.*
- *O envoltório nuclear é constituído por duas membranas e um número variável de poros que controlam o trânsito de partículas.*
- *As proteínas nucleares são sintetizadas nos polirribosomas citoplasmáticos, porém com um sinal que marca sua destinação.*
- *A cromatina é constituída pelos cromosomas interfásicos.*
- *A cromatina que permanece condensada na intérfase chama-se heterocromatina.*
- *Cada cromosoma é uma hélice dupla de DNA associada a proteínas, principalmente histonas.*
- *Os genes são segmentos específicos de DNA que codificam moléculas de RNA.*
- *Os nucléolos são locais de síntese de rRNA e de montagem das subunidades ribosômicas.*
- *A principal enzima para a síntese de DNA é a DNA-polimerase III.*
- *A síntese de DNA é semiconservadora. Cada dupla hélice tem um filamento antigo e um filamento novo.*
- *Os erros na síntese de DNA geralmente são corrigidos imediatamente.*
- *Os segmentos de DNA que iniciam a replicação chamam-se réplicons.*
- *Em cada cromosoma há vários réplicons.*
- *A síntese de DNA nos cromosomas de um mesmo núcleo não é sincronizada.*
- *O núcleo celular possui mecanismos para reparar o DNA danificado por agentes químicos, radiações etc.*
- *O conjunto dos cromosomas mitóticos de uma espécie animal ou vegetal constitui seu cariótipo.*
- *Nos tecidos que se renovam constantemente, as células percorrem um ciclo com as fases G1, S, G2 e M.*
- *A fase M ou mitose é subdividida em prófase, metáfase, anáfase e telófase.*
- *A meiose tem lugar na formação dos gametas, para reduzir à metade o número de cromosomas.*

A maior parte da informação genética de cada célula está acumulada no DNA do núcleo, sob uma forma codificada. Existe também uma pequena porção de informação genética fora do núcleo, nas mitocôndrias e cloroplastos. A informação genética armazenada no DNA pode ser duplicada (replicação) ou transcrita sob a forma de RNA, que se traduz como proteína conforme o esquema abaixo:



O DNA acumula as informações selecionadas durante a evolução, permitindo que as gerações sucessivas se beneficiem dos aperfeiçoamentos introduzidos paulatinamente durante o processo evolutivo.

Como a maioria das células se divide por um processo chamado **mitose** (*mitos,* filamento), costuma-se estudar o núcleo segundo sua relação com a mitose. Chama-se **intérfase** a fase celular entre duas mitoses, e, habitualmente, analisam-se separadamente o **núcleo na intérfase** e o **núcleo em mitose.**

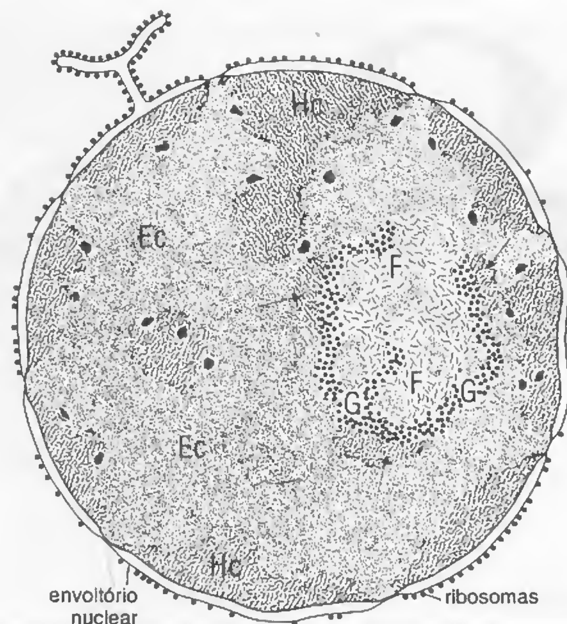


Fig. 8.1 Desenho esquemático ilustrando a estrutura do núcleo, que é abarcado pelo envoltório nuclear com os seus poros. O envoltório nuclear é uma dependência do retículo endoplasmático, estando constituído por duas membranas que delimitam as cisternas perinucleares, bem visíveis no desenho. A membrana externa do envoltório nuclear apresenta ribosomas. A cromatina apresenta-se condensada em certas regiões (heterocromatina, Hc) e frouxa em outras (eucromatina, Ec). Os grânulos densos e grosseiros são os grânulos peri- e intercromatínicos de RNA. No nucléolo, observar a cromatina associada (setas) e porções fibrilares e granulares (F e G). Esparsas no interior do nucléolo, aparecem regiões com eucromatina (pontas de seta) que contêm genes para RNA ribosômico.

O núcleo na intérfase é metabolicamente muito ativo: sintetiza RNA e DNA

O núcleo interfásico é também, impropriamente, chamado de **núcleo em repouso**. Esta fase apresenta uma alta atividade metabólica, pois, além da duplicação (replicação) do DNA, ocorre nela a transcrição dos diferentes tipos de RNA.

No núcleo interfásico, distinguem-se os seguintes componentes: **envoltório, cromatina, nucleoplasma, matriz** e **nucléolos** (Fig. 8.1).

O núcleo é, em geral, único e esférico ou ovóide, localizando-se no centro da célula ou ligeiramente desviado. Existem também muitos núcleos de forma irregular (Fig. 8.2). Há células com dois ou mais núcleos. São exemplos a célula hepática, que freqüentemente tem dois núcleos, e a fibra muscular esquelética, que tem várias dezenas de núcleos. Geralmente a forma do núcleo é esférica, mas pode ser achatada (como no caso das células glandulares mucosas) ou lobulada (nos glóbulos brancos polimorfonucleares do sangue, por exemplo).

As células prismáticas têm núcleos alongados, ao passo que as células poligonais ou esféricas têm núcleos esféricos. Como freqüentemente é difícil perceber ao microscópio óptico a forma das células animais, a forma do núcleo é muito usada para dar uma idéia da forma da célula. Células cúbicas têm núcleos esféricos, enquanto as células colunares têm núcleos geralmente ovóides. Com o auxílio do microscópio de contraste de fase, observam-se, no interior do núcleo da célula viva, a cromatina e o nucléolo.

O envoltório nuclear tem poros e é constituído por duas membranas

O **envoltório nuclear** só é visível ao microscópio eletrônico, pois sua espessura está abaixo do poder de resolução do microscópio óptico. O que foi descrito como membrana nuclear, no microscópio óptico, é a condensação periférica da cromatina. O microscópio eletrônico mostrou que o envoltório nuclear é constituído por duas unidades de membrana limitando um espaço que mede de 10 a 50 nm (Fig. 8.1). A membrana interna apresenta, na sua face interna, um espessamento chamado de **lâmina**, que é parte da **matriz nuclear**. A membrana externa apresenta ribosomas na sua face citoplasmática. A membrana externa do envoltório nuclear se continua com o retículo endoplasmático do citoplasma, razão pela qual é considerada uma porção deste retículo que envolve o conteúdo nuclear (Figs. 8.1 e 8.3).

O envoltório nuclear não é contínuo, estando interrompido por **poros**, uniformemente espaçados, que estabelecem comunicação entre o interior do núcleo e o citoplasma (Figs. 8.1, 8.4 e 8.5). Os poros têm forma redonda. Em regra, seu diâmetro oscila em torno de 100 nm. São constituídos por um complexo de monômeros protéicos formando oito unidades que se associam, limitando um canal (Fig. 8.6). A quantidade de poros por unidade de área do envoltório nuclear varia com o tipo de célula e o seu estágio funcional. Os poros podem cobrir de 1,2 a 25% da área total do envoltório nuclear. Portanto, há área suficiente para um franco intercâmbio núcleo-citoplasmático. No entanto, tem-se demonstrado que a passagem de material do citoplasma para o núcleo, ou vice-versa, não é livre, e também aí se observam diferenças marcantes de célula para célula.

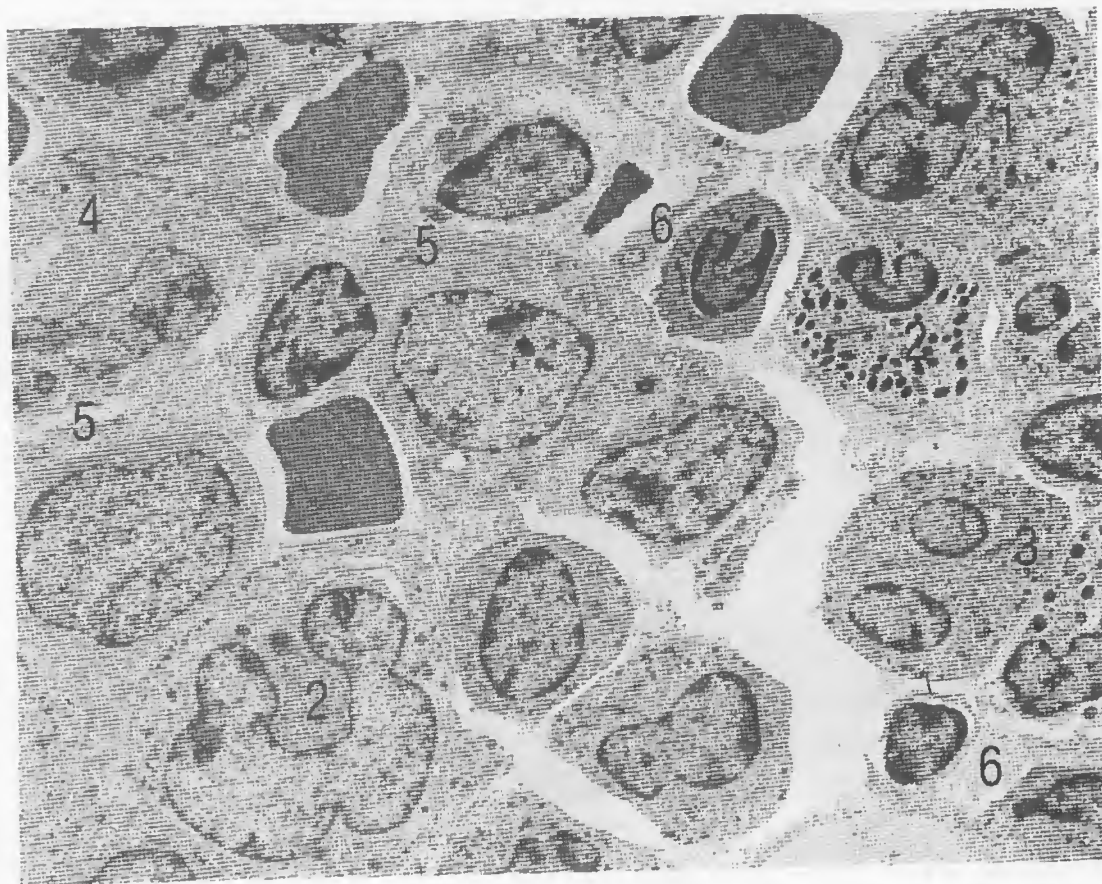


Fig. 8.2 Eletromicrografia de medula óssea onde se observam vários tipos de núcleos. Em 1, núcleo em forma de S. Em 2, em forma de U. Em 3, dois núcleos arredondados. Em 4, núcleo alongado. Em 5, núcleos com cromatina frouxa e, em 6, núcleos com cromatina condensada. 4.000 ×.

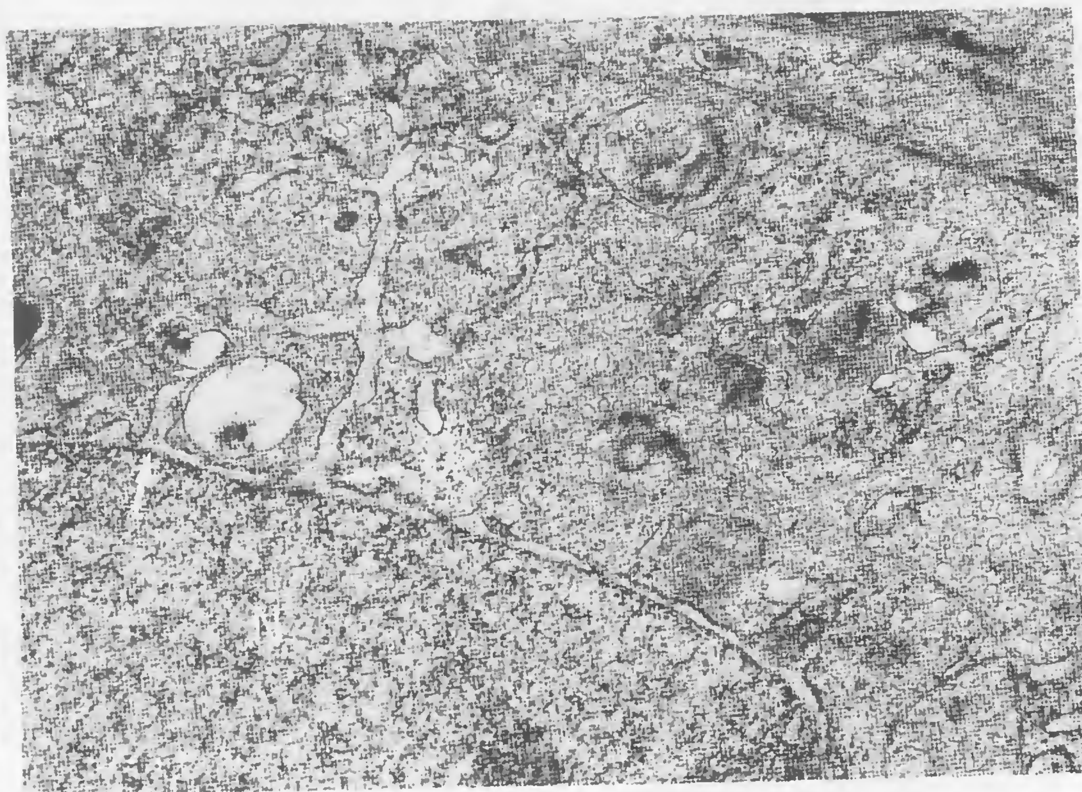


Fig. 8.3 Eletromicrografia de corte de célula mostrando a continuidade da membrana externa do envoltório nuclear com o retículo endoplasmático (seta). Em N, o núcleo. (Cortesia de E. C. Farias.) 28.500 ×.

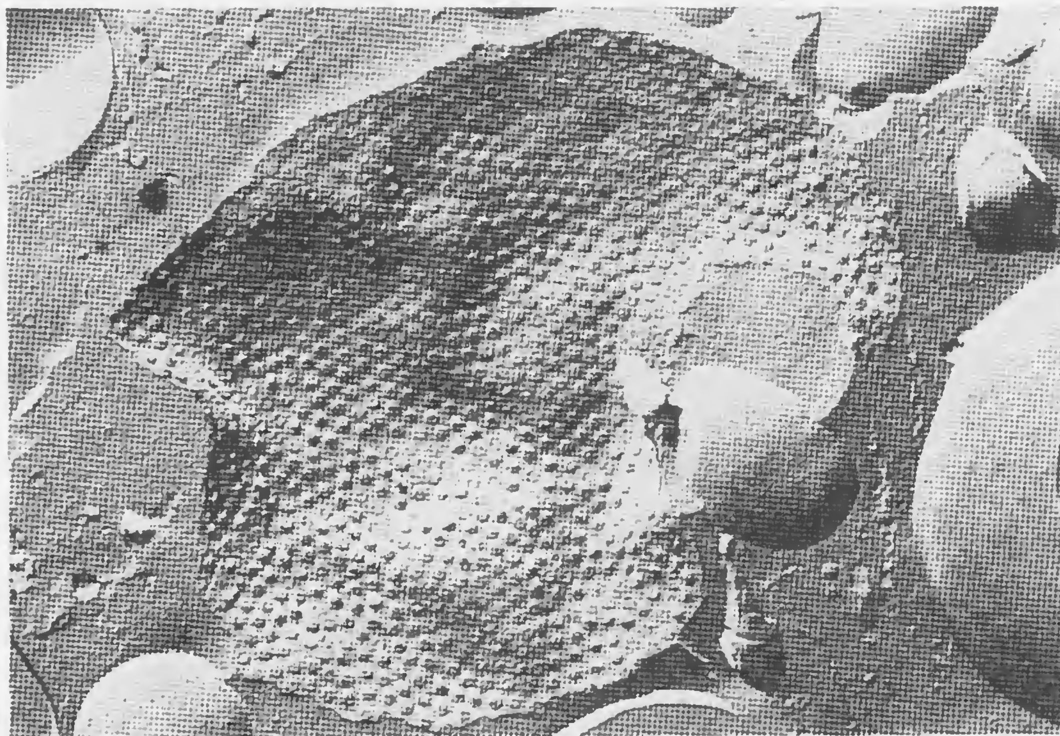


Fig. 8.4 Envoltório da ameba *Entamoeba histolytica*. Preparado obtido pelo método de criofratura mostrando, nitidamente, o grande número de poros nucleares. (Cortesia de A. Martinez-Palomo.) 20.000 ×.

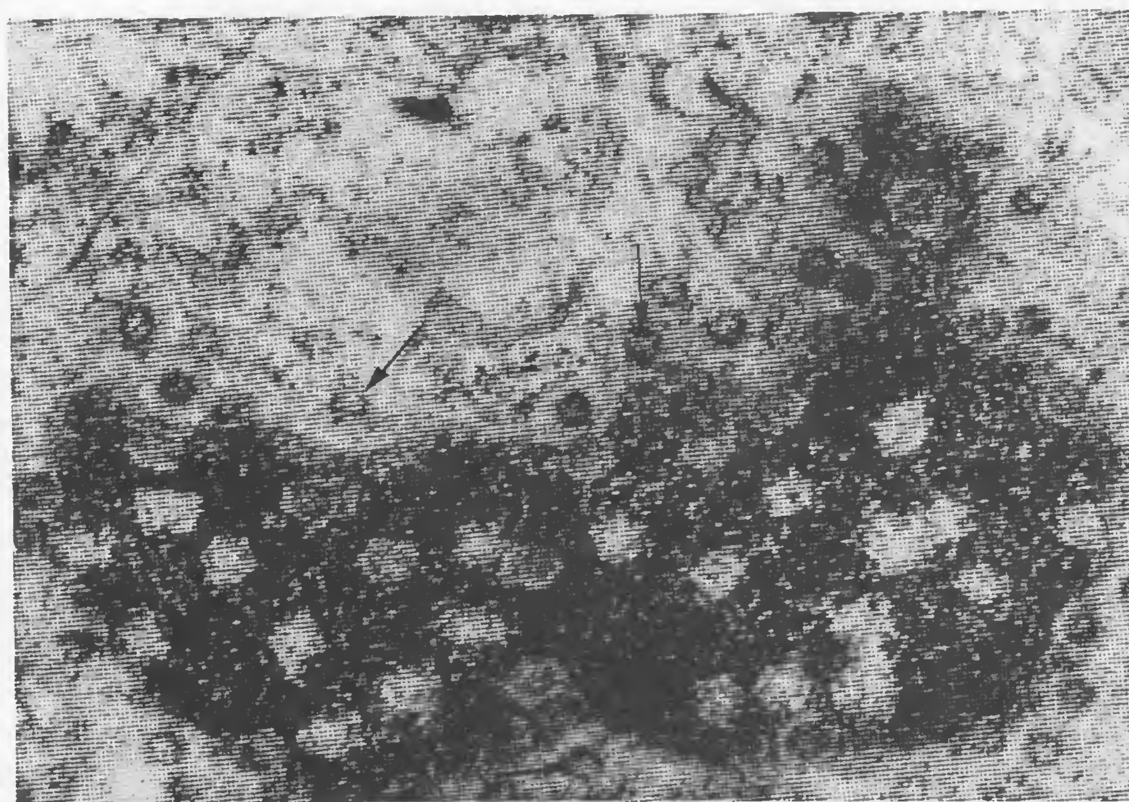


Fig. 8.5 Eletromicrografia de corte oblíquo de calota nuclear de célula renal de macaco. Embaixo, a cromatina condensada, onde se observam falhas nas regiões correspondentes aos poros nucleares. Logo acima e também abaixo, setas apontam os poros do envoltório nuclear, onde se nota uma evidente estrutura eletrodispersante. Observe-se o aspecto em anel elétron-denso, visível em alguns poros. 45.000 ×.

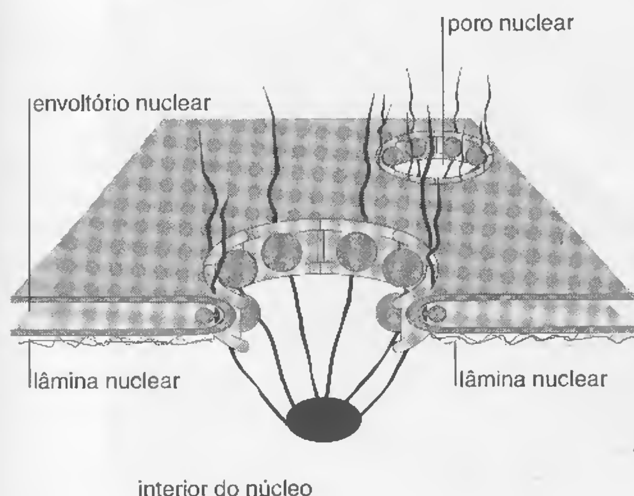


Fig. 8.6 Desenhos esquemáticos de dois poros nucleares, podendo-se ver que eles são formados por oito unidades protéicas. De cada unidade parte um prolongamento para o lado do citosol e outro para o interior do núcleo. No lado intranuclear existe uma estrutura em forma de cesta. Por esses poros passam as subunidades ribosômicas, do núcleo para o citoplasma. Dentre as inúmeras proteínas que penetram no núcleo estão as enzimas que participam da síntese e reparação do DNA, síntese dos três tipos de RNA e muitas outras proteínas enzimáticas e estruturais, pois a síntese protéica tem lugar no citoplasma. O desenho mostra ainda a lâmina nuclear que faz parte da matriz do núcleo.

Através da injeção no citoplasma de proteínas estranhas à célula, foi possível determinar que proteínas com peso molecular de até 17.000 dáltons apresentam concentração nuclear igual à citoplasmática em 2 minutos. Já uma proteína de 44.000 dáltons leva 30 minutos para atingir o equilíbrio entre sua concentração nuclear e citoplasmática, e proteínas com mais de 60.000 dáltons praticamente não entram no núcleo, mantendo-se exclusivamente no citoplasma.

Todavia, o núcleo necessita importar do citoplasma, normalmente, proteínas de peso molecular elevado, como as polimerases do DNA e do RNA, cujas subunidades pesam 100.000 a 200.000 dáltons. As proteínas próprias do núcleo são sintetizadas no citoplasma com um **sinal nuclear específico**, constituído por um segmento de 4-8 aminoácidos, rico nos aminoácidos lisina e arginina, que têm carga elétrica positiva. Essas proteínas marcadas para destino nuclear atravessam os poros por mecanismo desconhecido mas que consome energia fornecida por ATP. Aparentemente, o poro reconhece essas proteínas, fixa-as e as empurra para dentro do núcleo, por processo ativo. O sinal contido nas proteínas destinadas ao núcleo não é removido depois que a proteína entra no núcleo, o que é uma vantagem, pois permite sua reintrodução quando o envoltório nuclear se refaz após a mitose. É claro que, durante as fases mitóticas, em que o envoltório nuclear se desorganiza, as proteínas citoplasmáticas e nucleares se misturam.

O espaço ou **cisterna perinuclear** contém as mesmas proteínas presentes nas cisternas do retículo endoplasmático. Esta observação, associada à continuidade entre o envoltório nuclear e o retículo endoplasmático, mostra que o envoltório nuclear é uma porção especializada do retículo endoplasmático. É interessante observar que, quando se estimula uma célula para sintetizar uma determinada proteína (é o caso de um antígeno que estimula células imunocompetentes a produzir um anticorpo), o primeiro local da célula onde aparece a proteína produzida é entre as duas membranas do envoltório nuclear (cisterna perinuclear). Isto provavelmente ocorre por ser ela a porção do retículo endoplasmático granular que primeiro tem acesso ao RNA mensageiro, cuja produção foi induzida pelo estímulo.

Os cromosomas, na intérfase, constituem a cromatina

O termo **cromatina** (*croma*, cor) designa, com exceção dos nucléolos, toda a porção do núcleo que se cora e é visível ao microscópio óptico. A cromatina é constituída por desoxirribonucleoproteína, que se apresenta em vários graus de condensação. A disposição da cromatina dentro do núcleo e o seu grau de condensação variam de um tipo celular para outro, e são característicos de cada tipo celular; além disso, o mesmo tipo celular pode apresentar a cromatina com vários graus de condensação, de acordo com o estágio funcional da célula.

De modo geral, as células nervosas e os espermatócitos (células precursoras dos espermatozóides), em certa fase, apresentam a cromatina em forma pouco condensada (Fig. 8.7). Os plasmócitos (células produtoras dos anticorpos) já apresentam grumos densos de cromatina em seus núcleos. Os eritroblastos (*eritro*, vermelho, e *blasto*, germe), células que se transformam nos glóbulos vermelhos do sangue, sofrem uma condensação gradual da cromatina durante sua maturação (Fig. 8.8), e este processo culmina, nos mamíferos, com a expulsão do núcleo. Como será visto mais adiante, o estado de condensação da cromatina tem um significado importante.

O termo **heterocromatina** (*hetero*, distinto) designa as porções de cromatina que aparecem condensadas no núcleo interfásico, em contraposição com a maioria da cromatina, que se apresenta difusa e recebeu o nome de **eucromatina** (*eu*, verdadeiro). A condensação típica da heterocromatina impede que o DNA nela contido seja transcrito em RNA; trata-se, portanto, de porções inativas dos cromosomas. Distinguem-se dois tipos de heterocromatina: a **heterocromatina constitutiva** e a **heterocromatina facultativa**.

A **heterocromatina constitutiva** é a porção permanentemente condensada da cromatina (em todas as células de um mesmo organismo) que se localiza principalmente na extremidade dos cromosomas e, também, perto do centrômero e nas regiões organizadoras do nucléolo. Muitas vezes, porções de heterocromatina constitutiva se agregam no núcleo interfásico, formando os **cromocentros**. No núcleo interfásico, a heterocromatina, que se dispõe perto da região do organizador nucleolar, aparece sob a forma da **cromatina associada ao nucléolo**, visível nas Figs. 8.1 e 8.13. A heterocromatina constitutiva é formada por uma ou mais seqüências curtas de DNA altamente repetitivas (muitos milhares de cópias) e chega a constituir 10 a 25% do DNA nuclear.

Em alguns casos, a fração das seqüências altamente repetitivas pode ser identificada por centrifugação em gradiente de cloreto de césio e foi denominada de **DNA satélite**.

A **heterocromatina facultativa** é a parte da heterocromatina que, num mesmo organismo, se apresenta condensada em algumas células, mas não em outras. A heterocromatina facultativa

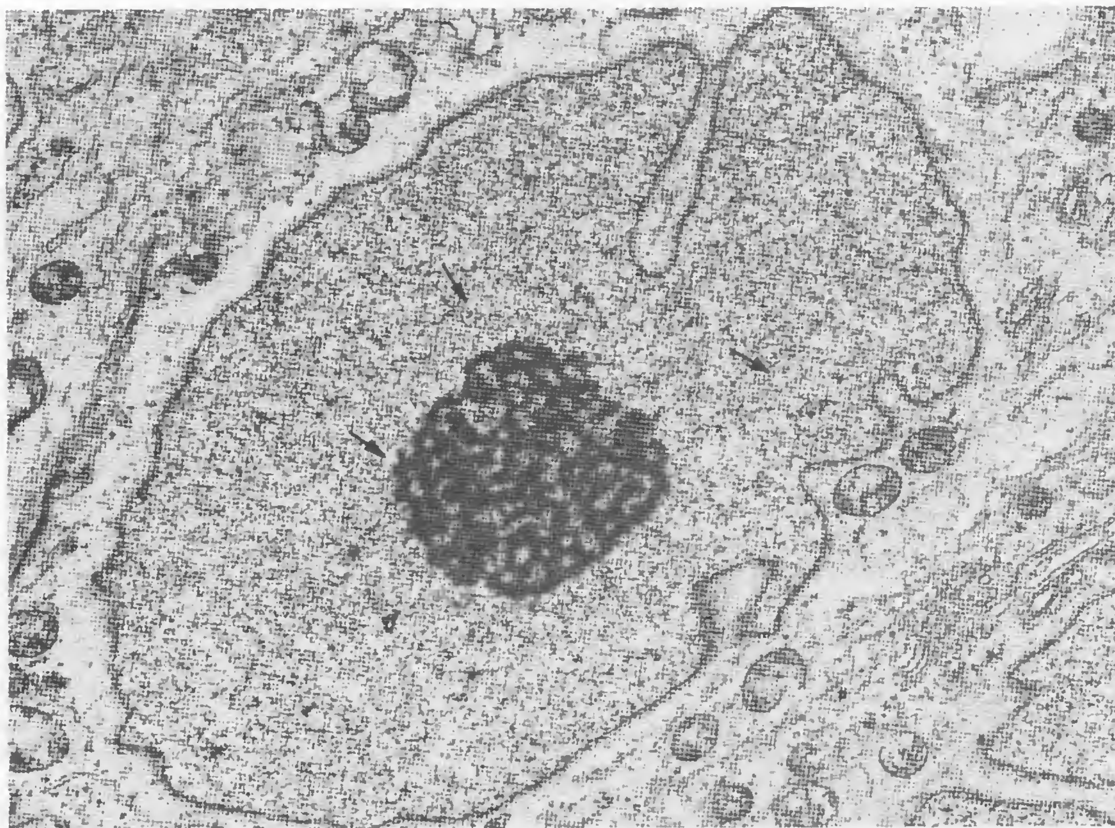


Fig. 8.7 Eletromicrografia de célula do testículo. Notar o nucléolo, formando uma estrutura enovelada. Entre as malhas do nucléolo, observa-se cromatina. No restante do núcleo, a cromatina está uniformemente dispersa (pouco condensada) sem formar grumos; o envoltório nuclear é bem visível. Em alguns pontos (setas), a cromatina mostra aspecto filamentoso. 10.000 ×.

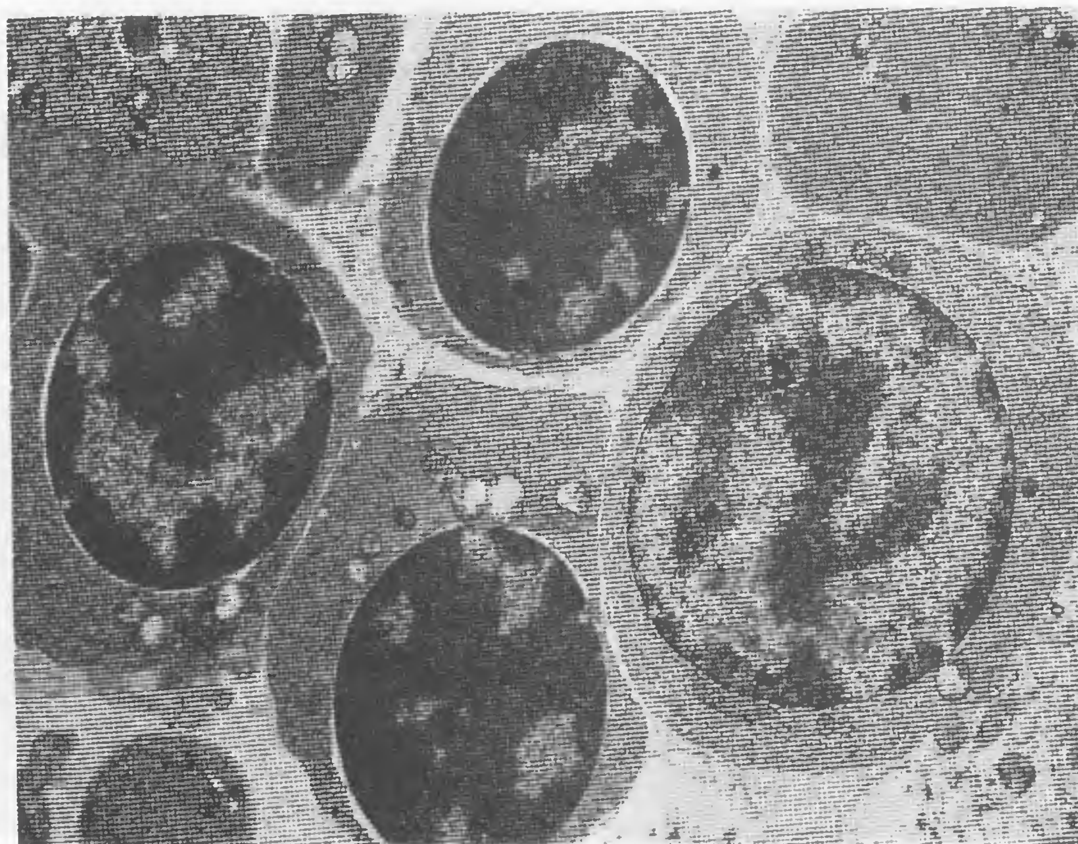


Fig. 8.8 Eletromicrografia de corte de medula óssea. As quatro células que aparecem com seus núcleos são eritroblastos. Observe a variação no grau de condensação da cromatina desses núcleos. Sabe-se que os núcleos mais condensados pertencem aos eritroblastos mais maduros. 11.000 ×.

também não se transcreve, mas não é formada por seqüência simples de DNA e pode apresentar-se em muitas células sob a forma de eucromatina, com grande atividade de transcrição gênica (formação de RNA). A quantidade de heterocromatina facultativa é muito diferente, conforme o tipo celular e seu estágio. As células embrionárias são muito pobres neste tipo de cromatina, que é mais abundante nas células diferenciadas. Provavelmente, à medida que a célula se diferencia, parte de sua cromatina torna-se inativa, assumindo o aspecto condensado típico da heterocromatina.

A cromatina sexual da fêmea dos mamíferos é um exemplo de heterocromatina facultativa. A condensação de um dos cromosomas X das fêmeas ocorre ao acaso. Numas células, o cromosoma X condensado (heterocromatina) é de origem materna e, em outras, de origem paterna.

Em conseqüência, o corpo feminino é um mosaico contendo, possivelmente em todos os órgãos, células com o cromosoma X paterno (Xp) inativo e outras com o cromosoma X materno (Xm) inativo. Muito cedo na vida embrionária, aproximadamente metade das células têm o Xm inativado e, na outra metade, é o cromosoma Xp que é inativado. Nos dois casos, o X inativado é transmitido nesta condição para as células-filhas, e desta maneira os diversos órgãos do corpo feminino contêm dois clones celulares, um com Xm inativado e outro com Xp inativado. É óbvio que, no clone com Xm inativado, o cromosoma Xp é funcional e ativo na transcrição dos genes, enquanto, no clone com Xp inativado, o cromosoma X ativo é o Xm. Um exemplo deste fato é a doença da pele chamada **displasia ectodérmica anidrótica**, que se caracteriza pela deficiência na estrutura e funcionamento das glândulas sudoríparas. Esta doença é transmitida por um cromosoma X e, nas mulheres, apresenta-se como um mosaico de áreas de pele doente, alternando com áreas de pele normal. As células que ficaram com o cromosoma X doente ativado multiplicam-se, não se afastam muito do local de origem e vão constituir as áreas com glândulas sudoríparas defeituosas. Essas áreas doentes são bem delimitadas e se alternam com áreas de pele normal cujas células são portadoras do cromosoma X sadio ativado.

Nos mamíferos do sexo feminino, o cromosoma X condensado é observado, no interior do núcleo ou associado ao envoltório nuclear, como uma partícula esférica que se cora fortemente, à qual se dá o nome de **cromatina sexual** (Fig. 8.9). Esta cromatina se apresenta também sob outras formas: por exemplo, nos glóbulos brancos polimorfonucleares neutrófilos, ela aparece como uma protuberância do núcleo em forma de raqueta (Fig. 8.9). A presença ou não de cromatina sexual permite, pois, o diagnóstico citológico do sexo.

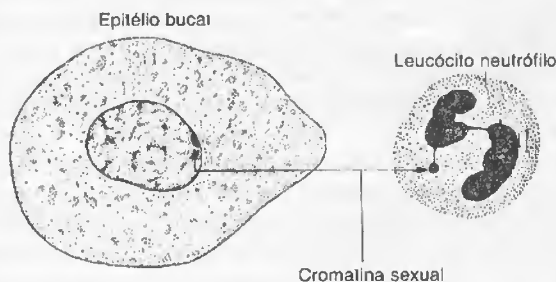


Fig. 8.9 Desenho ilustrando a morfologia da cromatina sexual em célula do epitélio bucal e no leucócito neutrófilo humano. Na célula epitelial, a cromatina sexual aparece como uma pequena massa densa aderida à membrana nuclear; no neutrófilo, como uma raqueta presa a um lobo do núcleo.

A cromatina é fortemente basófila

A cromatina é quimicamente formada por DNA associado a proteínas, dentre as quais se destaca uma classe de **proteínas básicas**, de peso molecular baixo, denominadas **histonas**. Estas proteínas se ligam ao DNA graças à interação de seus radicais amina com os radicais fosfato do DNA. Nem todos os radicais fosfato estão neutralizados pelas histonas, o que dá à cromatina um caráter ácido, isto é, uma grande capacidade para ser corada por corantes básicos, propriedade denominada **basofilia**. De acordo com a fase do ciclo em que a célula está, a cromatina pode apresentar-se em graus variados de condensação. Na intérfase está menos condensada, ao passo que, na mitose, os filamentos de cromatina se condensam intensamente, formando os cromosomas da metáfase. Nos espermatozóides, a cromatina representa 80% da massa nuclear, sendo a forma mais condensada de cromatina que se conhece. O núcleo do espermatozóide é, pois, um pacote condensado de cromatina, o que está de acordo com sua função de transporte do genoma no sexo masculino. Dependendo da espécie animal, o DNA dos espermatozóides pode ser associado a histonas ou a outro tipo de proteína básica, as **protaminas**. As histonas são constituídas principalmente por cinco tipos de proteínas, chamadas de H1, H2A, H2B, H3 e H4.

As histonas são proteínas pequenas, ricas em aminoácidos básicos (carga positiva), como arginina e lisina. Devido à sua carga positiva, as histonas se combinam fortemente com os radicais fosfato do DNA, e esta combinação não depende da seqüência de nucleotídeos. Como as histonas se mantêm presas ao DNA, devem influir de modo permanente nas reações químicas que têm lugar nos cromosomas.

Os cinco tipos de histonas podem ser divididos em dois grupos: as **histonas dos nucleosomas** e as **histonas H1**. As histonas dos nucleosomas são moléculas menores, com 102 a 135 aminoácidos, responsáveis pela estruturação dos nucleosomas, que serão descritos adiante, neste capítulo. São designadas H2A, H2B, H3 e H4. A seqüência de aminoácidos destas histonas se conservou de modo excepcional durante a evolução. Por exemplo, H4 de ervilha e H4 bovina têm apenas dois aminoácidos diferentes. Provavelmente, as funções das histonas envolvem quase todos os seus aminoácidos, e as mutações que modificaram estes aminoácidos tornaram as células mutantes inviáveis, eliminando-as.

As histonas do grupo H1 são maiores, com cerca de 220 aminoácidos, e mostram menor grau de conservação durante a evolução.

Nas moléculas das histonas, geralmente distinguem-se três regiões (Fig. 8.10). Uma região é globular, devido ao enovelado da cadeia polipeptídica, e apresenta-se entre duas regiões filamentosas. Os aminoácidos básicos encontram-se principalmente no segmento filamentoso N terminal. Os aminoácidos das histonas podem ser acetilados ou fosforilados, processos que levam a uma modificação da carga eletrostática da histona, modificando sua interação com o DNA e influindo na conformação da cro-

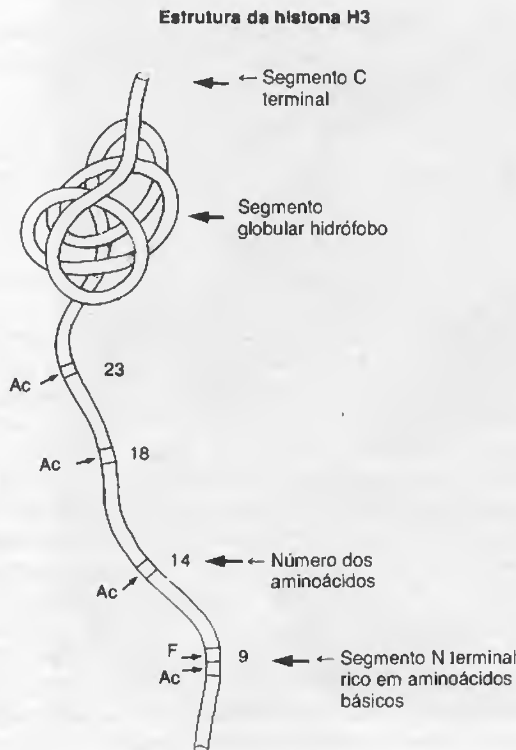


Fig. 8.10 Estrutura da histona H3. Observe os dois segmentos terminais não-globulares separados por um segmento globular. No segmento N estão indicados os locais de acetilação das lisinas (Ac) e fosforilação das serinas ou treoninas (F). A porção enovelada da molécula das histonas nucleosômicas é constituída por alta percentagem de aminoácidos hidrofóbicos, e sua associação, dentro do nucleosoma, deve-se a interações hidrofóbicas. Pode-se separar, por procedimento químico, a molécula de DNA das moléculas de histonas. Mas, quando o DNA e as histonas são colocados juntos, em condições favoráveis, ocorre novamente a formação espontânea de nucleosomas. Trata-se de uma automontagem, sem gasto de energia.

matina. Por exemplo, foi observada uma relação entre a fosforilação das histonas e as diferentes fases da mitose.

Além das proteínas básicas, a cromatina contém proteínas não-histônicas e RNA. As proteínas não-histônicas do núcleo podem encontrar-se ligadas ao DNA ou dispersas no nucleoplasma. As células metabolicamente mais ativas (como, por exemplo, os neurônios e as células glandulares) apresentam alto teor de proteínas não-histônicas. Devido à sua heterogeneidade, é difícil estudar a química das proteínas não-histônicas do núcleo. Do ponto de vista das suas atividades funcionais, é, porém, possível distinguir os seguintes grupos:

a) Proteínas que participam da estrutura dos cromosomas. São mais de 30 proteínas que têm esta função e que colaboram na disposição e compactação do DNA nos cromosomas mitóticos.
b) Proteínas relacionadas com os processos de replicação e reparação do DNA (DNA-polimerase, helicase, topoisomerases).
c) Proteínas que participam do processo de ativação e repressão gênica.

O núcleo contém RNA, pois todo o RNA é produzido na cromatina, migrando posteriormente para o citoplasma (exceto o RNA das mitocôndrias e cloroplastos).

A cromatina é constituída por filamentos de DNA associados a proteínas e formando nucleosomas

A cromatina é constituída por unidades de repetição de associação de histonas com DNA.

A análise da Fig. 8.24 mostra que os cromosomas são constituídos por filamentos compostos por uma cadeia dupla de DNA que, periodicamente, se enrola duas vezes em torno de uma partícula protéica constituída por oito partículas polipeptídicas (octâmero) contendo duas partículas de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4. Cada octâmero protéico destes, envolto por duas voltas de DNA, recebe o nome de nucleosoma (*soma*, partícula). Entre os nucleosomas existe uma porção de DNA, chamada de **região internucleosômica**, que se apresenta associada à histona H1. As histonas prendem-se aos nucleosomas devido a interações entre os grupos básicos destas proteínas e os radicais fosfato do DNA. A cadeia de DNA e histonas assume o aspecto de um colar de pérolas que mantém uma certa distância entre si. Este colar de pérolas enrola-se aproximando os nucleosomas e dando em resultado um filamento com 30 nm de diâmetro, que aparece nas micrografias eletrônicas de cromosomas tratados por métodos suaves. Os filamentos com 30 nm de diâmetro são denominados **fibras de cromatina**. A histona H1 tem papel relevante na forma destas fibras, pois estabelece pontes entre nucleosomas próximos. As fibras de cromatina correspondem aos **cromonemas** dos antigos citologistas. Na mitose, as fibras de cromatina se enrolam em espiral em torno de um eixo protéico (Fig. 8.24), dando origem aos cromosomas com o aspecto condensado típico da divisão celular.

Conteúdo e tipos de DNA

É possível medir o conteúdo do DNA dos núcleos por dois métodos: um deles é a determinação bioquímica em núcleos separados mediante homogeneização do tecido e centrifugação fracionada; o outro é a citofotometria. Os resultados obtidos indicam que os núcleos têm uma quantidade constante de DNA para cada espécie. Nos vertebrados, por exemplo, esta quantidade pode variar desde aproximadamente 2 picogramas (picograma = 10^{-12} g), como se observa na maioria das aves, até um máximo de 150 picogramas, encontrados nos anfíbios urodelos (a salamandra *Amphiuma* tem 168 picogramas de DNA em seu núcleo). As células humanas têm 5,6 picogramas por núcleo. A grande maioria das células de uma espécie de eucarionte tem a mesma quantidade de DNA, mas algumas apresentam 2, 4, 8 ou mais vezes DNA que a maioria dos núcleos. Nestes casos, diz-se que existe o fenômeno de **poliploidia** (*polis*, numerosos, e *eidos*, forma) (Fig. 8.11).

Na série dos seres vivos, a análise do conteúdo de DNA mostra, em geral, um incremento à medida que se progride na escala evolutiva (Fig. 8.12). Entre os vertebrados existem exceções entre o nível evolutivo e o conteúdo de DNA, e o caso mais evidente é o de certos urodelos, com teor umas 30 vezes superior ao humano. Nos peixes pulmonados, também se encontram altas taxas de DNA e, em ambos os casos, se desconhece o significado biológico deste fenômeno. A quantidade de DNA nas células dos vertebrados está bastante acima do teor mínimo necessário para armazenar a informação genética da espécie.



Fig. 8.11 Fotomicrografia de corte da glândula lacrimal extra-orbital. Observa-se a variabilidade no tamanho dos núcleos. Muitas células dessa glândula são, normalmente, poliplóides e têm núcleos maiores. 600 ×.

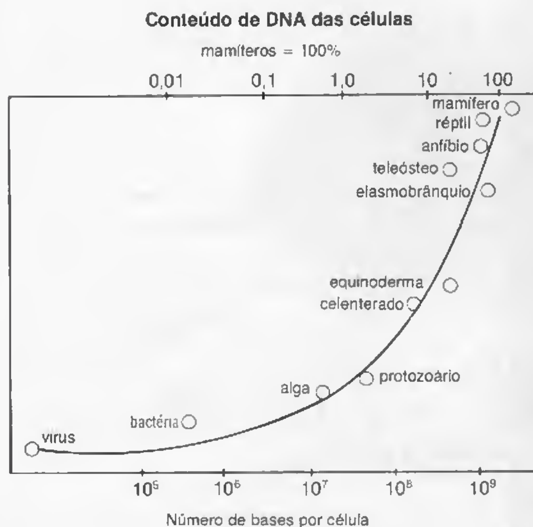


Fig. 8.12 Conteúdo de DNA na série filogenética. (Dados de Hood L. E. et al. *Molecular Biology of Eucariotic Cells*. Benjamin Publ., 1975.)

O DNA das células eucariontes apresenta três frações caracterizadas pelo grau de repetição (ou redundância) de suas seqüências nucleotídicas. Em uma delas, cada seqüência de nucleotídeo só se encontra uma vez por genoma haplóide, e, provavelmente, estas seqüências contêm a maioria dos genes estruturais, isto é, aqueles genes que codificam proteínas. Esta fração é mais abundante.

A segunda fração de DNA, quantitativamente menor que a primeira, apresenta seqüências nucleotídicas repetidas um moderado número de vezes, entre 100 e 10.000 cópias de cada seqüência. A seguir, serão dados dois exemplos de seqüências moderadamente repetitivas, também chamadas redundantes: (1) os genes responsáveis pela síntese de RNA ribosômico são repetitivos em numerosas espécies. No organismo humano, cada célula contém de 150 a 200 cópias desses genes; (2) os genes que codificam para as histonas também são repetitivos: algumas dezenas de cópias no homem, 100 na *Drosophila* e de 300 a 1.000 no ouriço-do-mar, por exemplo.

Por último, a terceira fração de DNA mostra seqüências nucleotídicas altamente redundantes (acima de 10.000 cópias) e constitui, em geral, a fração minoritária. Este DNA se encontra na **heterocromatina constitutiva**. Ele foi isolado e recebe, em alguns casos, o nome de DNA **satélite**, porque os primeiros DNAs deste tipo que foram descobertos tinham uma proporção de nucleotídeos tão diferente que podiam ser separados do resto do DNA, aparecendo como um componente menor ou "satélite". O DNA satélite é constituído por seqüências de pequeno tamanho, altamente repetidas e que se agrupam em blocos em regiões definidas do cromosoma.

A célula pode produzir cópias adicionais de um gene

O número de cópias de um gene pode ainda ser aumentado por outro mecanismo: a **amplificação gênica**. Enquanto a redundância é um fenômeno filogenético, a amplificação representa um fenômeno essencialmente ontogenético. Através deste mecanismo, uma célula pode, durante a vida do indivíduo, produzir cópias adicionais de um gene e, por conseguinte, aumentar rapidamente a produção de um determinado RNA. A amplificação é um fenômeno não muito comum e pode ocorrer tanto por seqüências únicas de DNA como para locos redundantes. Alguns exemplos de amplificação serão dados a seguir: (1) como será explicado adiante, nos cromosomas politênicos alguns pufes apresentam aumento do teor de DNA evidenciável pela reação de Feulgen, que permite uma visualização morfológica dessa amplificação; (2) o gene produtor da proteína coriônica do ovário de *Drosophila* também é amplificado; (3) os genes responsáveis pela síntese de RNA ribosômico, além de redundantes, mostram uma amplificação em muitos organismos; e (4) amplificação do gene responsável pela síntese da hidrofolato redutase observada em culturas de tecidos submetidas à ação do metotrexato, um agente quimioterápico utilizado no tratamento do câncer. A amplificação do gene do hidrofolato explica por que certos tumores se tornam insensíveis a esse quimioterápico.

Como seria de supor, o volume nuclear acompanha a quantidade de DNA. Os núcleos das células de *Amphiuma* e, em geral, dos urodelos são os maiores que se conhecem nos vertebrados, e os núcleos das aves, com conteúdo baixo de DNA, são, em geral, pequenos. Este paralelismo entre o volume nuclear e o conteúdo de DNA também se estende ao volume celular. Um exemplo interessante são os glóbulos vermelhos nucleados (típicos de vertebrados não-mamíferos), onde o conteúdo de DNA

Tabela 8.1 Relação entre tamanho e conteúdo de DNA nas hemácias nucleadas dos vertebrados

Espécie	Diâmetro médio em µm	DNA em pg (10^{-12}g)
Galo (ave)	10	2
Esturjão (peixe ganóide)	12	2
Lagarto (réptil)	12	5
Rana (anfíbio anuro)	19	15
Lepidosiren (peixe dipnóico)	35	100
Amphiuma (anfíbio urodelo)	63	168

guarda, de modo geral, um paralelismo com o tamanho celular. Uma vez mais os eritrócitos de urodelo (*Amphiuma*) são os maiores conhecidos, e os das aves, os menores (Tabela 8.1).

Por outro lado, existem variações de volume nuclear independentes do seu conteúdo em DNA. Muitas vezes existem, em diversos tecidos da mesma espécie, núcleos grandes e claros ao lado de núcleos pequenos densamente corados, e a medição com o citofotômetro mostra o mesmo conteúdo de DNA. Os núcleos claros e de maior volume contêm mais proteínas não-histônicas, apresentam cromatina mais dispersa e sintetizam mais ativamente RNA do que os núcleos escuros. Esta observação reforça a hipótese, sugerida há vários anos, de que os núcleos claros teriam uma atividade metabólica mais intensa do que os escuros e de que haveria um ciclo nuclear, onde períodos de alta atividade metabólica se alternariam com outros de baixa atividade. Estes estudos bioquímicos foram reforçados por estudos de radioautografia em microscopia eletrônica. A injeção de um precursor radioativo de RNA (uridina tritiada) permitiu observar que, dentro de um mesmo núcleo de leucócito, as porções que apresentam radioatividade mais intensa (com maior densidade de grãos de prata de radioautografia) aparecem sobre porções de cromatina frouxa, demonstrando maior intensidade de síntese de RNA a este nível.

O nucléolo é o local de síntese do RNA ribosômico

Os **nucléolos** são estruturas esféricas e densas que se coram intensamente. Têm um diâmetro de 1 a 3 µm e se alojam dentro dos núcleos. Apesar de existirem núcleos com dois ou mais nucléolos, freqüentemente o nucléolo é único. Em geral estão associados a uma massa de cromatina acoplada à sua periferia. É a cromatina associada ao nucléolo. No microscópio eletrônico, o nucléolo aparece como uma massa densa e compacta, com cavidades cheias de cromatina (Figs. 8.1 e 8.7). Com aumentos grandes (Fig. 8.13) se comprova que o nucléolo apresenta áreas constituídas por grânulos e áreas compostas de fibrilas. A parte fibrilar é constituída de DNA e a parte granular consiste em partículas precursoras das subunidades ribosômicas. Depois de acabadas ou quase acabadas, estas subunidades migram para o citoplasma e vão formar os ribosomas. As diferenças no tamanho

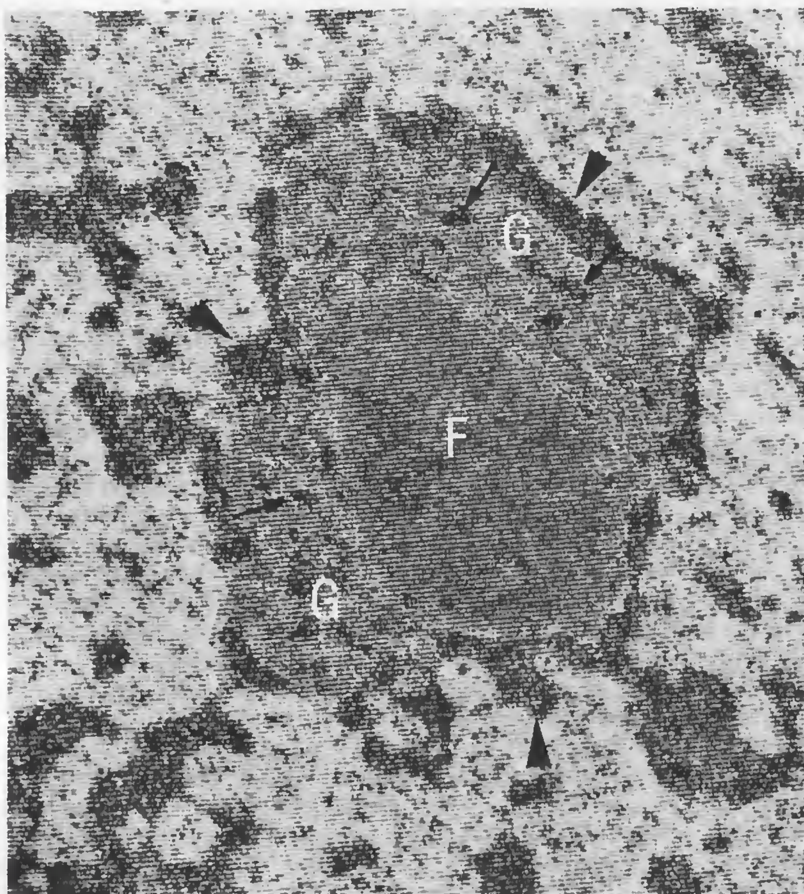


Fig. 8.13 Eletromicrografia de núcleo de célula epitelial do intestino. Observe o nucléolo com sua cromatina associada (pontas de seta). No centro, a porção fibrilar do nucléolo (F) envolta pela região granular (G). As setas mostram cromatina nucleolar. 26.000 ×.

dos nucléolos dependem principalmente do componente granular. A **cromatina associada ao nucléolo** aparece geralmente em um dos seus lados (Figs. 8.1 e 8.13) e pode enviar ramificações ao interior do nucléolo. A maior parte do RNA do nucléolo é sintetizada na cromatina não-condensada, contendo os genes para os rRNAs e situada no interior do nucléolo (Fig. 8.14). O sítio onde essa cromatina está localizada e que, portanto, forma o nucléolo é denominado de **região organizadora do nucléolo**. Em geral, as células têm apenas uma região organizadora do nucléolo, mas várias espécies têm mais de uma. A espécie humana, por exemplo, tem cinco e, por isso, uma célula humana pode ter até cinco nucléolos. O tamanho dos nucléolos está, em geral, relacionado com a intensidade da síntese protéica que ocorre no citoplasma. As células que sintetizam proteínas ativamente, ou por secretarem proteínas ou por se reproduzirem rapidamente, têm nucléolos maiores que outros tipos celulares. Por esse motivo, as células indiferenciadas dos embriões ou de tecidos que crescem rapidamente — como certos tumores malignos — apresentam nucléolos bem evidentes. É possível, com o auxílio do ultra-som, romper os núcleos, liberando assim os nucléolos, que podem, então, ser separados por centrifugação fracionada. O estudo dessas frações mostra que os nucléolos são estruturas densas contendo uns 60% de matéria seca, principalmente proteínas e RNA ribosômico. Aparece também pequena quantidade de DNA, provavelmente correspondente à cromatina que contém os genes para os rRNAs. A síntese dos ribosomas é um processo complexo, apresentado de maneira simplificada na Fig. 8.14.

Os componentes do núcleo celular apresentam organização espacial definida

A associação das técnicas de extração, fracionamento e microscopia eletrônica sugere que existe uma estrutura fibrilar formando um endoesqueleto nuclear, a **matriz nuclear**, equivalente do citoesqueleto já descrito no citoplasma. Foi observado também que, na intérfase, os cromosomas não estão localizados ao acaso, mas ocupam locais determinados no interior do núcleo. Esta observação reforça a idéia de que os componentes nucleares têm uma organização espacial precisa e se apóiam nas estruturas fibrilares da matriz nuclear.

Os únicos componentes desta matriz razoavelmente conhecidos são as **laminas A, B** e **C**. Estas proteínas formam a **lâmina**

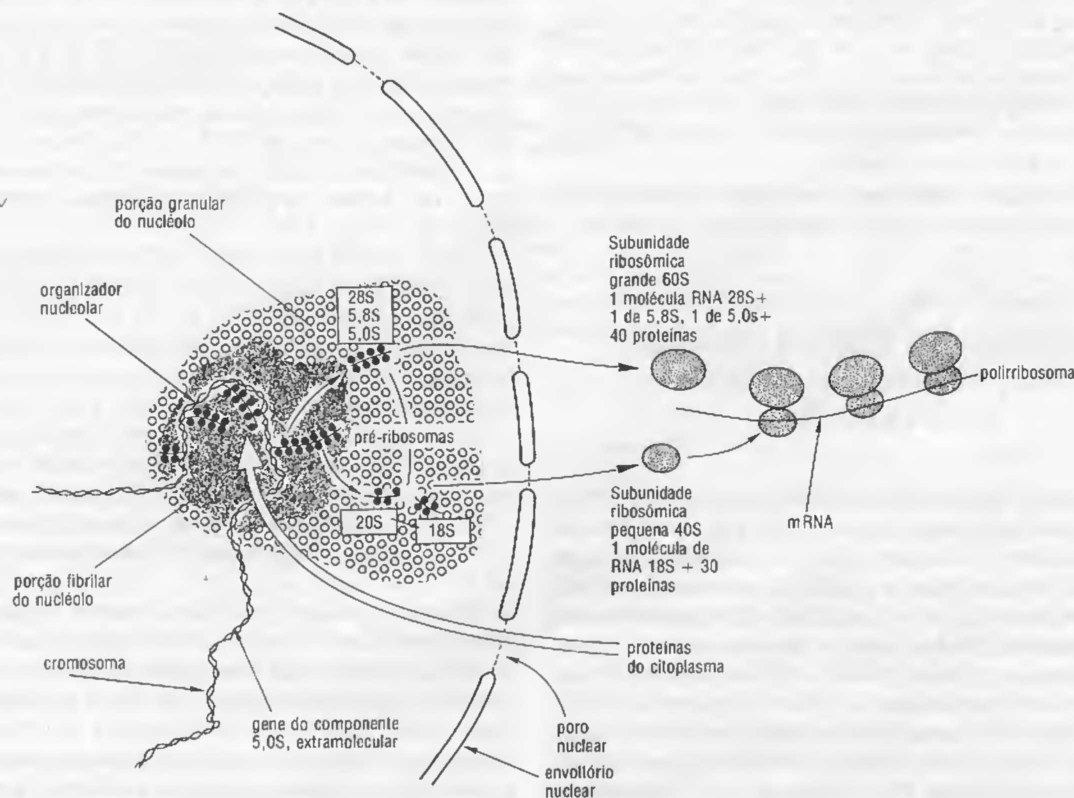


Fig. 8.14 Desenho esquemático explicando a síntese e montagem, no nucléolo, das subunidades ribosômicas. Basicamente, o processo consiste na síntese de RNA na cromatina e associação desse RNA a proteínas sintetizadas no citoplasma, formando, na região fibrilar do nucléolo, uma partícula 80S (S =Svedberg, unidade que indica a velocidade de deposição de partículas durante ultracentrifugação), que, depois de transformações complexas, dá origem às duas subunidades do ribosoma, uma de 60S e outra de 40S. A subunidade 60S apresenta três moléculas de RNA, com 28S, 5,8S e 5S, e 50 tipos diferentes de proteínas. Todos os RNAs ribosômicos, exceto o RNA 5S, são codificados pelo DNA da cromatina associada ao nucléolo. A subunidade 40S apresenta apenas uma molécula de RNA 18S que provém de um precursor 20S e se associa a 30 proteínas. O acabamento das duas subunidades que formarão os ribosomas ocorre na região granular no nucléolo. Daí elas migram, através dos poros nucleares, indo associar-se no citoplasma, no momento da síntese protéica.

nuclear, que é uma rede com 10-20 nm de espessura, presa à superfície interna do envoltório nuclear (Fig. 8.6). Nesta rede, os filamentos de laminas se cruzam em ângulo reto e estão ausentes ao nível dos poros nucleares.

Cada molécula de lamina é um dímero de subunidades protéicas e apresenta uma parte filamentosa com duas porções globulares numa das extremidades. Observada com grande aumento ao microscópio eletrônico, aparece como um bastonete com duas "cabeças". Em condições apropriadas de pH e concentração iônica, os dímeros das laminas se polimerizam espontaneamente e formam filamentos muito parecidos com os filamentos intermediários do citoplasma.

Durante a mitose a fosforilação temporária das moléculas de serina das laminas causa a desorganização da lâmina nuclear. Quando o envoltório nuclear se reconstitui após a mitose, as laminas são desfosforiladas e se associam novamente para refazer a lâmina nuclear.

Nucleoplasma

Apresenta-se como uma solução aquosa de proteínas, metabólitos e íons que preenche o espaço entre a cromatina e os nucléolos. Talvez seja a fração menos conhecida do núcleo, pois, devido à sua difusibilidade, é, em parte, perdida durante os métodos de preparação de frações nucleares. Entre as proteínas do nucleoplasma, estão as enzimas da glicólise, que contribuem para a produção de energia no núcleo interfásico. Além destas enzimas, foram descritas várias outras, tais como as DNA-polimerases e as RNA-polimerases.

Entre os metabólitos, encontram-se os intermediários da glicólise e da via das pentoses, coenzimas, íons e nucleosídeos.

A replicação do DNA foi estudada principalmente na bactéria Escherichia coli

O mecanismo de duplicação do DNA tem sido estudado de preferência nas células mais simples, como a *Escherichia coli*. Mas os resultados obtidos nessa célula procarionte são, na essência, válidos também para as células eucariontes. As células procariontes possuem enzimas denominadas **DNA-polimerases**, capazes de sintetizar DNA a partir de seus precursores. A principal enzima na duplicação do DNA é a DNA-polimerase III, que está presente com 10 moléculas em cada célula, embora a DNA-polimerase I (300 a 400 moléculas por célula) e a DNA-polimerase II (40 moléculas por célula) sejam mais abundantes. A atividade da DNA-polimerase III se realiza da seguinte maneira: 1) Os precursores de DNA devem estar presentes sob a forma de **desoxirribonucleotídeos trifosfato**. Os quatro desoxirribonucleotídeos trifosfato necessários para a síntese de DNA são dATP, dCTP, dTTP e dGTP, contendo as bases **adenina**, **citosina**, **timina** e **guanina**, respectivamente. Além de fornecerem os desoxirribonucleotídeos, os mencionados precursores proporcionam energia para a síntese dos novos filamentos de DNA, porque são trifosfatos, enquanto os desoxirribonucleotídeos incorporados no DNA são monofosfatos. A ruptura das ligações fosfato excedentes libera a energia que é usada na síntese de DNA. Obviamente se forma, ao mesmo tempo, fosfato inorgânico. 2) A DNA-polimerase só sintetiza um filamento novo de DNA na presença de um filamento antigo que serve como modelo (*template*). A síntese da dupla hélice de DNA é necessariamente **semiconservadora** (Figs. 8.15 e 8.16). Para cada nova molécula de DNA corresponde outra que já estava pronta. 3) Os desoxirribonucleotídeos se organizam de modo que suas bases sejam complementares (AT e CG) das bases do filamento antigo de DNA. Portanto, a seqüência de bases na nova molécula (filamento) de DNA depende exclusivamente da seqüência na molécula antiga.

Estudos radioautográficos ao microscópio eletrônico mostraram que a incorporação de timidina-H^3 (uma precursora de DNA) tem lugar principalmente onde os dois filamentos de DNA da hélice dupla que constitui o cromosoma bacteriano se separam. Estes locais têm a forma da letra Y e são chamados *replicating forks* ou **forquilhas de replicação** (Fig. 8.17). Como as DNA-polimerases agem começando pela extremidade 5' e terminando pela extremidade 3' da nova molécula, a síntese é feita de modo contínuo sobre um dos filamentos (filamento 3'-5'), mas não sobre o outro (Fig. 8.17). Conforme foi explicado no Cap. 3, os dois filamentos de DNA da hélice dupla são antiparalelos, isto é, um deles tem a direção 5'-3' e o outro a direção contrária, 3'-5'. Por isso, num dos filamentos originais (o filamento 5'-3'), separado na forquilha de replicação (*replicating fork*), o novo filamento de DNA é sintetizado aos pedaços, de modo descontínuo, sendo cada pedaço começado por 5' e terminado em 3'. Pouco a pouco, os pedaços se vão completando até formarem um filamento novo inteiro. Existe, assim, uma assimetria na síntese dos filamentos novos de DNA de cada cromosoma. O filamento que é sintetizado inteiro é chamado de cadeia *leading*, e o filamento que é feito em pedaços que depois são soldados é a cadeia *lagging* (Fig. 8.18).

Como os dois filamentos de DNA do cromosoma original estão firmemente ligados graças às numerosas pontes de hidrogênio entre suas bases (ver Cap. 3), torna-se necessária a ação de uma enzima, a **helicase**, para separar os filamentos da dupla hélice que vai ser copiada. Nesse processo de ruptura de pontes de hidrogênio, há consumo de energia, que é fornecida por ATP. Além da enzima helicase, há também a participação de proteínas específicas, as **proteínas SSP** (*single strand proteins*), que mantêm os filamentos separados enquanto se processa a replicação. Essas proteínas impedem que as pontes de hidrogênio entre as bases se refaçam depois de desfeitas pela helicase (Fig. 8.18).

É preciso notar que a DNA-polimerase III não consegue iniciar a síntese de DNA sem o auxílio de um iniciador ou *primer* de RNA, porque ela só é capaz de adicionar nucleotídeos a um polinucleotídeo preexistente. Esse RNA naturalmente é sintetizado tendo como molde os filamentos de DNA separados na forquilha de replicação. Os *primers* para os pequenos fragmentos de DNA da cadeia *lagging* são produzidos pela ação de uma RNA-polimerase especial, denominada **primase**. Mas o *primer* para a cadeia de DNA *leading* é sintetizado pela RNA-polimerase que, usualmente, sintetiza RNA na transcrição. Nos dois casos, a DNA-polimerase III estende essa molécula iniciadora de RNA (*primer*), formando um filamento de DNA que contém um segmento mínimo de RNA. Posteriormente, os *primers* de RNA são removidos das moléculas mistas que constituem as cadeias novas, ficando apenas os nucleotídeos que constituem a cadeia de DNA.

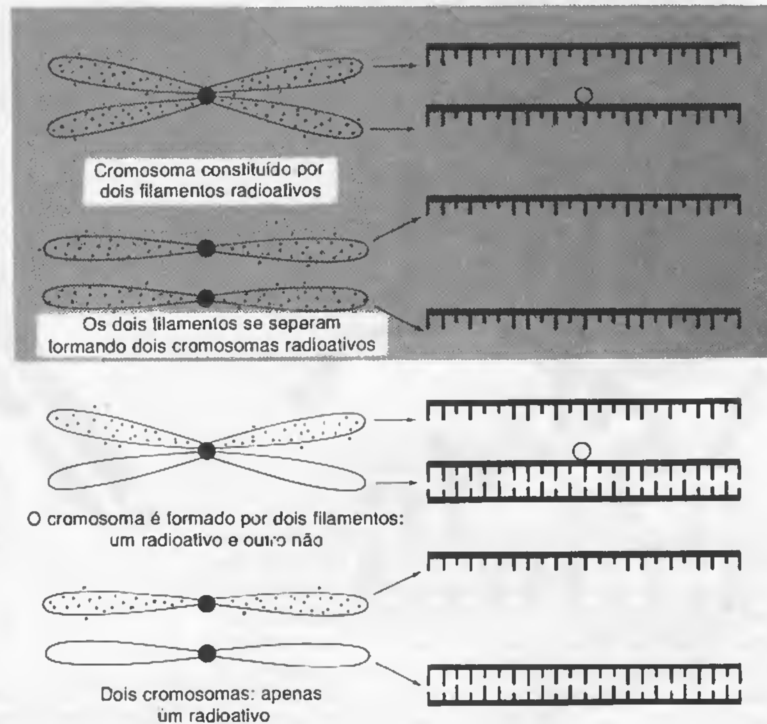


Fig. 8.15 Ilustrando a experiência de Taylor e cols., que demonstra a replicação semiconservadora do DNA. Raízes de feijão foram colocadas em solução contendo timidina H^3, durante algum tempo e, depois, transferidas para um meio sem timidina H^3. A região escura da figura representa o período com o isótopo. Periodicamente, uma raiz era retirada da solução e tratada por colchicina para estacionar as mitoses em metáfase, e os seus cromosomas eram estudados pela técnica radioautográfica. O aparecimento de grãos de prata sobre os cromosomas indica a incorporação de timidina H^3 nessas estruturas. Durante a fase S ocorreu duplicação do DNA, com o aparecimento de radioatividade em todos os cromosomas. Na duplicação seguinte, que ocorre na ausência de timidina H^3, apenas a metade dos cromosomas é radioativa. Esse resultado só pode ser explicado pela teoria semiconservadora. (Baseado nos resultados de T. H. Taylor, P. S. Woods e W. L. Hughes. Proc. Natl. Acad. Sci. [Wash], *43*:122, 1957.)

Todavia, para que a replicação do DNA possa ocorrer, é preciso, inicialmente, desenrolar as voltas da hélice dupla, problema mais complexo nos cromosomas das células eucariontes, mas também existente nas células procariontes. Essas voltas na hélice ainda se acentuam mais à medida que a forquilha de replicação aumenta de tamanho. O desdobramento das voltas da hélice dupla é feito pelas enzimas denominadas **DNA-topoisomerases** (Fig. 8.18), que consomem energia fornecida por ATP.

Apesar de sua complexidade, a replicação do DNA é extremamente precisa, estimando-se que é cometido apenas um erro na replicação de 10^9 bases. Esta precisão é devida principalmente a uma propriedade especial da DNA-polimerase III: ela é capaz de conferir as bases à medida que as adiciona ao novo filamento de DNA. Essa característica da enzima DNA-polimerase III chama-se *proofreading*. A DNA-polimerase III confere as bases adicionadas e remove imediatamente uma base errada, antes que a síntese do filamento de DNA continue (Fig. 8.19). Seria como uma correção tipográfica onde a letra errada fosse corrigida antes de terminada a palavra inteira.

A velocidade de duplicação do DNA é calculada em torno de 30 μm por minuto na bactéria *Escherichia coli*, e de 0,5 a 2,0 μm por minuto nos cromosomas das células eucariontes dos vertebrados. Com esta velocidade, os cromosomas dos vertebrados gastariam um tempo muito longo para sua replicação, se o processo começasse por um extremo do cromosoma e terminasse pelo outro. Isto realmente não acontece, e foi possível demonstrar que a replicação se inicia, simultaneamente, em vários pontos do cromosoma. Uma vez iniciada a replicação em locais predeterminados situados ao longo dos cromosomas, os **locais de iniciação**, ela se propaga para os dois lados (replicação bidirecional), até encontrar a replicação do local vizinho. Cada segmento de DNA capaz de iniciar a replicação chama-se **réplicon**. A distância entre dois locais de iniciação ou réplicons é muito variável, entre 10 a 250 μm. Em cada núcleo celular de mamífero existem 20.000 a 30.000 réplicons. A replicação é assincrônica, isto é, apesar de réplicons vizinhos replicarem simultaneamente, diferentes grupos de réplicons, no mesmo cromosoma, replicam em períodos diferentes da fase de síntese de DNA (fase S, ver adiante).

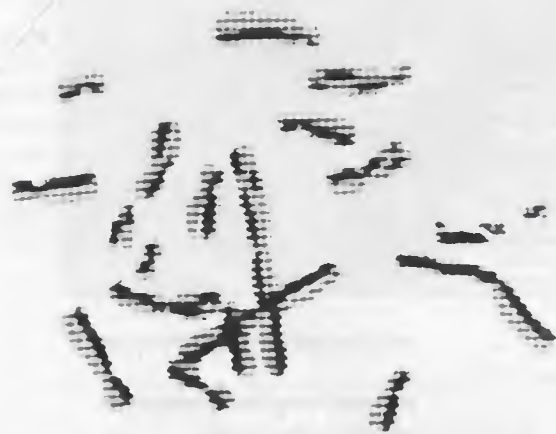


Fig. 8.16 Fotomicrografia de células previamente tratadas com bromodeoxiuridina. Esse composto entra na molécula de DNA, em lugar da timidina, modificando a afinidade tintorial do cromosoma, resultando em cromosomas constituídos por uma cromátide fortemente corada e outra que se cora muito fracamente. Esse aspecto confirma que a replicação do DNA é semiconservadora. A fotomicrografia mostra, também, a troca de material genético (DNA) entre as cromátides. (Cortesia de Wolff, S. e Perry, P. *Chromosoma*, *48*:341, 1974.)

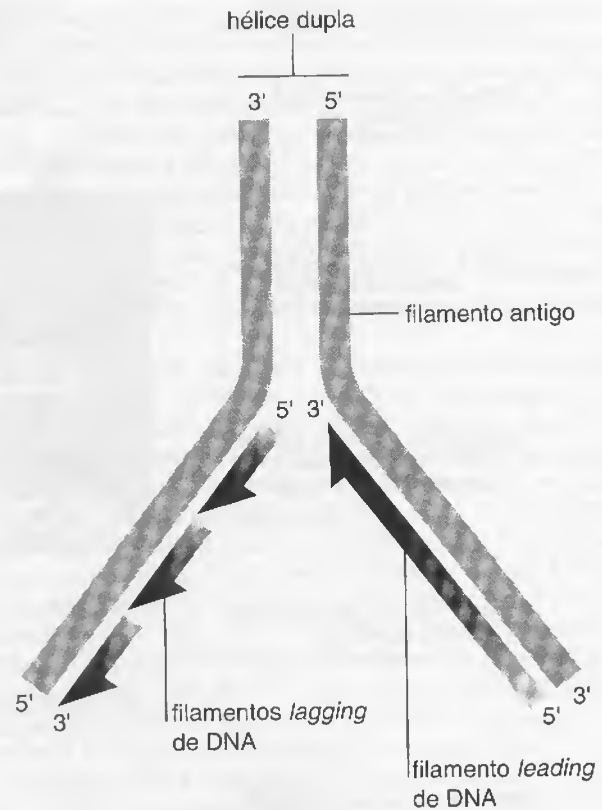


Fig. 8.17 Forquilha de replicação do DNA mostrando que um filamento novo é sintetizado de modo contínuo (filamento *leading*), mas o outro é sintetizado aos pedaços (filamento *lagging*).

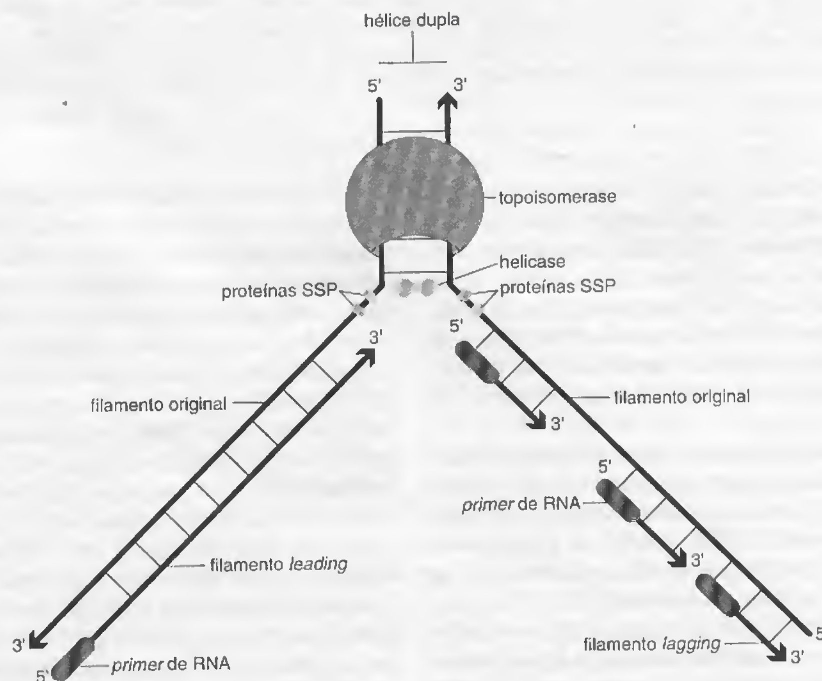


Fig. 8.18 Esquema mostrando enzimas e outras proteínas que participam da replicação do DNA. Desenho baseado nas observações feitas na bactéria *Escherichia coli*, um dos organismos onde a síntese de DNA tem sido muito estudada.



Fig. 8.19 Desenho mostrando a correção que tem lugar durante a síntese de DNA. No exemplo, a base incorreta é uma timina (T) que está sendo removida pela mesma DNA-polimerase que catalisa a síntese de DNA. O processo é conhecido como *proofreading*.

As células desenvolveram mecanismos para manter a integridade do seu DNA

As células sofrem a todo momento agressões físicas e químicas do ambiente, que podem alterar moléculas diversas. Os danos causados ao DNA são particularmente graves porque o DNA constitui os genes, que contêm todas as informações para a estrutura e para as atividades celulares. A alteração do DNA de uma célula somática transmite-se às células-filhas, podendo-se formar um clone de células modificadas. Quando as alterações do DNA ocorrem numa célula germinativa (óvulo, espermatozóide, ou respectivos precursores), podem passar para as gerações futuras dos organismos atingidos, sendo seus efeitos ainda mais prejudiciais para a espécie.

Os raios cósmicos e outras radiações com muita energia podem causar lesões por atuação direta, como modificações nas bases ou ruptura de filamentos de DNA da dupla hélice. Estas radiações podem, também, atuar indiretamente sobre o DNA, porque induzem o aparecimento de íons superóxido, quimicamente muito ativos. A radiação ultravioleta solar, embora possua energia muito menor, também pode causar alterações como a dimerização de timinas adjacentes (Fig. 8.20).

O DNA também sofre a ação de agentes químicos, alguns produzidos normalmente na própria célula. Calcula-se que os íons

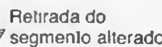


Fig. 8.20 Desenho ilustrando a seqüência dos processos num caso de reparação de DNA. Em **A**, devido à ação dos raios ultravioleta, duas timidinas contíguas se fundem formando um dímero. Em **B** e **C**, devido à ação de enzimas, o segmento alterado é retirado da molécula. Em **D** e **E**, dá-se a síntese de novo segmento, que é inserido na posição original. O fenômeno da reparação do DNA explica a possibilidade de haver uma pequena síntese na molécula de DNA em células que não estão se dividindo.

H^+ celulares e a agitação térmica retirem até 10.000 bases púricas por dia, em cada célula do organismo humano.

Para proteger seu DNA e outras moléculas, as células desenvolveram vários sistemas gerais de proteção. Os íons superóxido, por exemplo, são destruídos pela enzima superóxido-desmutase.

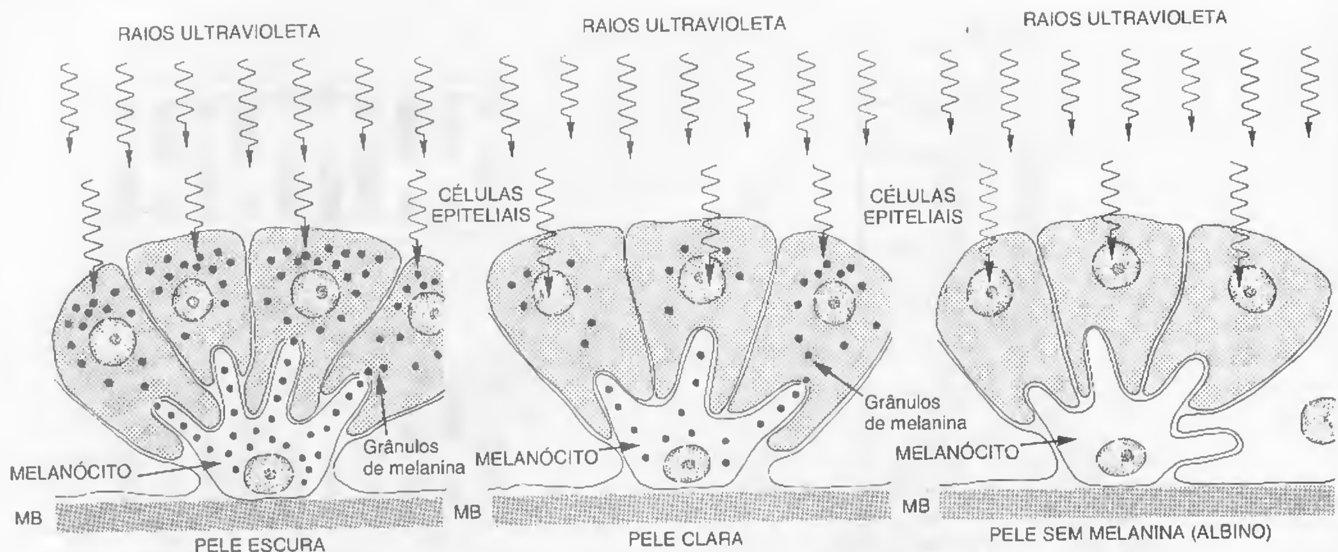


Fig. 8.21 Desenho esquemático ilustrando a proteção exercida pelo pigmento melanina contra a ação deletéria dos raios ultravioleta da luz do sol sobre as células da epiderme, camada mais superficial da pele. Os grânulos de melanina se localizam preferencialmente na região supranuclear, formando um capuz protetor para o DNA. Os raios ultravioleta podem lesar o DNA, levando a mutações sucessivas, que acabam cancerizando a célula. O desenho da esquerda representa a pele escura, onde a proteção oferecida pela melanina é máxima. As pessoas de pele clara, como mostra o desenho do centro, têm menos melanina e epiderme mais sensível aos raios ultravioleta. No albinismo, ocorre ausência total de melanina em todas as células (desenho da direita), o que torna a pele dos albinos muito sensível ao sol. Em conseqüência, a incidência de câncer da pele é baixa nas pessoas de pele escura, maior nas de pele clara e alta nos albinos. Nos três desenhos, MB indica a membrana basal que separa a epiderme da segunda camada da pele, a derme, não representada no desenho.

Os íons H^+ são neutralizados pelos sistemas reguladores do equilíbrio ácido-básico, e as oxidações intracelulares são reduzidas por diversos sistemas redutores, como o NADPH2, o glutation e a vitamina E. Outro exemplo de mecanismo protetor é a presença do pigmento pardo **melanina** nas células da epiderme, que constitui a camada mais externa da pele. Os grânulos de melanina se colocam principalmente sobre os núcleos das células epidérmicas, dificultando a passagem da luz solar, cujos raios ultravioleta são capazes de danificar o DNA (Fig. 8.21).

Além de estar sujeito aos agentes físicos e químicos mencionados, o DNA pode sair defeituoso da própria replicação, que não apresenta fidelidade absoluta apesar da capacidade de correção de provas (*proofreading*) da DNA-polimerase III, já descrita.

A correção do DNA danificado por agente químico ou físico é feita em duas fases, a primeira, específica para cada tipo de defeito, e a segunda, de natureza geral, igual em todos os casos. A primeira fase é a identificação da alteração e a remoção da parte defeituosa da molécula. Esta fase vale-se de mecanismos diversos para identificar os diferentes defeitos e cortar, por meio de endonucleases (enzimas que cortam pedaços da parte central da molécula de DNA), o segmento de DNA defeituoso. Na segunda fase, o segmento defeituoso removido é substituído por um segmento correto de DNA (Fig. 8.20).

A importância biológica da restauração do DNA pode ser avaliada pela extensão do genoma envolvido no processo e pelo que acontece com seres humanos, cujas células não corrigem certos defeitos do seu DNA. Exemplo do primeiro caso são as células da levedura, que têm mais de 50 genes diferentes cujos produtos (proteínas, enzima) participam da restauração do DNA da levedura. Outro exemplo é dado pelos pacientes com a doença hereditária *xeroderma pigmentosum*, que apresentam defeitos em pelo menos sete produtos gênicos envolvidos na restauração do DNA. As vítimas desta doença são extremamente sensíveis à radiação ultravioleta do sol e apresentam lesões cutâneas graves e câncer da pele, mesmo com pequenas exposições à luz solar. No *xeroderma pigmentosum*, as células são incapazes de corrigir a dimerização das bases pirimídicas. Estes dímeros são produzidos pela ação da radiação ultravioleta.

Sumário

A informação genética das celulas está codificada e armazenada, em sua maior parte, no DNA presente em seus núcleos. Durante sua vida, a célula passa por dois estágios, caracterizados pela sua divisão em duas células-filhas — a mitose — e pelo período que se intercala entre duas divisões sucessivas — a intérfase. O núcleo, na intérfase, pode apresentar-se sob várias formas, mas, em todas as células eucariontes, ele é separado do citoplasma por um envoltório duplo: o envoltório nuclear. Este envoltório, apesar de conter poros, impede o livre intercâmbio de substâncias entre o núcleo e o citoplasma. Na face interna do envoltório nuclear existe uma delgada camada de proteínas específicas: a lâmina nuclear. *Esta parte da matriz nuclear encontra-se, por outro lado, associada à cromatina. A cromatina engloba todo o DNA nuclear que se encontra formando um complexo estável com proteínas básicas: as histonas. A cromatina pode estar muito condensada e, nesta configuração, recebe o nome de* heterocromatina. *Dois tipos de heterocromatina são descritos. A heterocromatina constitutiva é formada por seqüências de DNA altamente repetitivas e está sempre condensada em*

todas as células de um mesmo organismo. A heterocromatina facultativa não contém DNA repetitivo e, numa espécie e até no mesmo indivíduo, pode estar condensada em certas células e não-condensada em outras. É o caso do cromossoma X das células das fêmeas de mamíferos. O DNA e as histonas constituem um complexo químico sob a forma de um filamento conhecido como cromonema. *Na formação desse filamento são observados vários passos, numa complexidade crescente. Inicialmente, a longa molécula de DNA se associa, de espaço em espaço, com partículas formadas por um octâmero de histonas, de modo que a cromatina, nesse estágio, apresenta-se como um colar de contas. As contas são denominadas de* nucleossomas. *Na etapa seguinte, esse filamento sofre um enrolamento helicoidal, dando origem a um fio mais espesso, com 30 nm de diâmetro. Por este processo, a enorme quantidade de DNA por núcleo existente nas células eucariontes pode ser compactada e alojar-se dentro do pequeno volume dos núcleos. A quantidade de DNA por núcleo, nas células dos seres vivos, mostra um incremento considerável quando se progride na escala evolutiva: quanto mais evoluído é o organismo, maior o teor de DNA de suas células. Existem, entretanto, numerosas exceções a esta regra, que, em parte, são explicadas pela existência de diversas classes de DNA. As células eucariontes apresentam três frações principais de DNA quando se considera o grau de replicação das seqüências de nucleotídeos. Num tipo, cada seqüência só se encontra uma vez por genoma (DNA de seqüência única), sendo esta a fração mais abundante. Os outros dois tipos contêm repetições de determinadas seqüências. Em um deles, o grau de repetição é moderado, de poucas cópias até alguns milhares delas. Como exemplo, citam-se os genes que codificam para as histonas e para os RNAs ribosômicos. O último tipo compõe-se por frações repetidas num grau muito elevado, da ordem de 100.000 ou mais. Além dessa repetição de seqüências, o número de cópias de algumas seqüências específicas pode, durante a vida do organismo, ser aumentado, independentemente das demais seqüências, por um processo denominado de* amplificação. *O aumento de DNA observado em algumas faixas dos cromossomas politênicos de alguns dípteros foi a primeira descrição do fenômeno da amplificação. A região organizadora do nucléolo, ou seja, a porção do DNA que contém os genes que codificam os RNAs ribosômicos, também pode sofrer amplificação em algumas espécies. Os nucléolos são estruturas esféricas que existem dentro dos núcleos, e são compostos por numerosas proteínas, pela porção do DNA que contém genes ribosômicos e pelos RNAs ribosômicos.*

O núcleo em divisão

A divisão celular foi chamada de **mitose** (*mitos*, filamento) devido ao aparecimento de filamentos que se coram intensamente e que foram denominados cromossomas (*croma*, cor, e *soma*, corpo). Na célula que não está em divisão, os cromossomas permanecem íntegros dentro do núcleo interfásico, porém é impossível visualizá-los porque se encontram muito alongados e entrelaçados uns com os outros. Todavia, no núcleo interfásico os cromossomas não estão colocados ao acaso. Ao contrário, há muitas evidências de que cada cromossoma ocupa uma localização espacial definida.

Cada espécie apresenta um número constante de cromossomas, que constitui seu **cariótipo**. A Fig. 8.22 ilustra o cariótipo humano.

Cada cromossoma mitótico apresenta uma região estrangulada, denominada **centrômero** ou ***constrição primária*** (Figs. 8.23 e 8.24), que desempenha papel importante nos movimentos mitóticos dos cromossomas, pois serve como local de inserção dos microtúbulos do fuso mitótico. De acordo com a posição dos centrômeros, distinguem-se quatro tipos gerais de cromossomas (Fig. 8.23). O estudo do centrômero ao microscópio eletrônico mostrou que ele apresenta, na sua superfície, duas porções em forma de disco na qual se inserem vários microtúbulos do fuso mitótico: são os **cinetocoros** (*cine*, movimento, e *coro*, centro). Os centrômeros contêm DNA, além dos cinetocoros.

Nas células dos animais, existem porções de heterocromatina constitutiva próximas aos centrômeros, de maneira que estas regiões apresentam-se condensadas na intérfase.

Além da constrição primária descrita como centrômero, certos cromossomas apresentam estreitamentos que aparecem sempre no mesmo lugar: são as **constrições secundárias**, muito utilizadas no reconhecimento e caracterização de cromossomas no cariótipo. Freqüentemente, no início da mitose e, mais evidentemente, nas primeiras etapas da meiose, quando os cromossomas aparecem bem individualizados, pode-se observar que os nucléolos (Fig. 8.25) freqüentemente se encontram associados a constrições secundárias.

O estudo da meiose e do processo de reorganização nuclear na telófase conduziu ao conhecimento de que a região organizadora do nucléolo está sempre localizada em uma constrição secundária. No entanto, nem todas as constrições secundárias contêm organizadores de nucléolos. Quando a porção de cromatina situada depois da constrição secundária é pequena, recebe o nome de **satélite do cromossoma** (não confundir com DNA satélite).

O número de cromossomas varia conforme a espécie

O estudo dos cromossomas foi muito influenciado pelo descobrimento da inibição mitótica durante a metáfase pela ação de um alcalóide chamado **colchicina**. As células assim tratadas, quando comprimidas entre lâminas e lamínulas, apresentam os seus cromossomas metafásicos num só plano (Fig. 8.22). O estudo morfológico dos cromossomas mostrou que há dois exemplares idênticos de cada um por célula diplóide. Portanto, nos núcleos existem pares de cromossomas chamados **homólogos**. Chamando-se n ao número básico de cromossomas de uma espécie, as células diplóides apresentarão, em seu núcleo, 2n cromossomas. Diz-se que uma célula é **haplóide** (*haplous*, simples, e *eidos*, forma) quando contém **n** cromossomas, como é o caso dos gametas (espermatozóides e óvulos). Na maioria dos seres pluricelulares, as células têm 2n cromossomas, sendo por isso **diplóides**. Uma pequena percentagem de células em certos tecidos (como, por exemplo, o fígado dos mamíferos) contém 4, 8 e até 16n. Estes núcleos são chamados **poliplóides** (*poli*, muito) e, como contêm 4, 8 e 16 vezes mais DNA que os núcleos haplóides, recebem o nome mais específico de núcleos ***tetraplóides***, **octoplóides** e **hexadecaplóides**, respectivamente. O número de cromossomas das diversas espécies biológicas é muito variável e vai desde 2n = 2, na lombriga intestinal do cavalo, *Ascaris megalocefala*, variedade *univalentes*, até mais de 1.000 em certos protozoári-

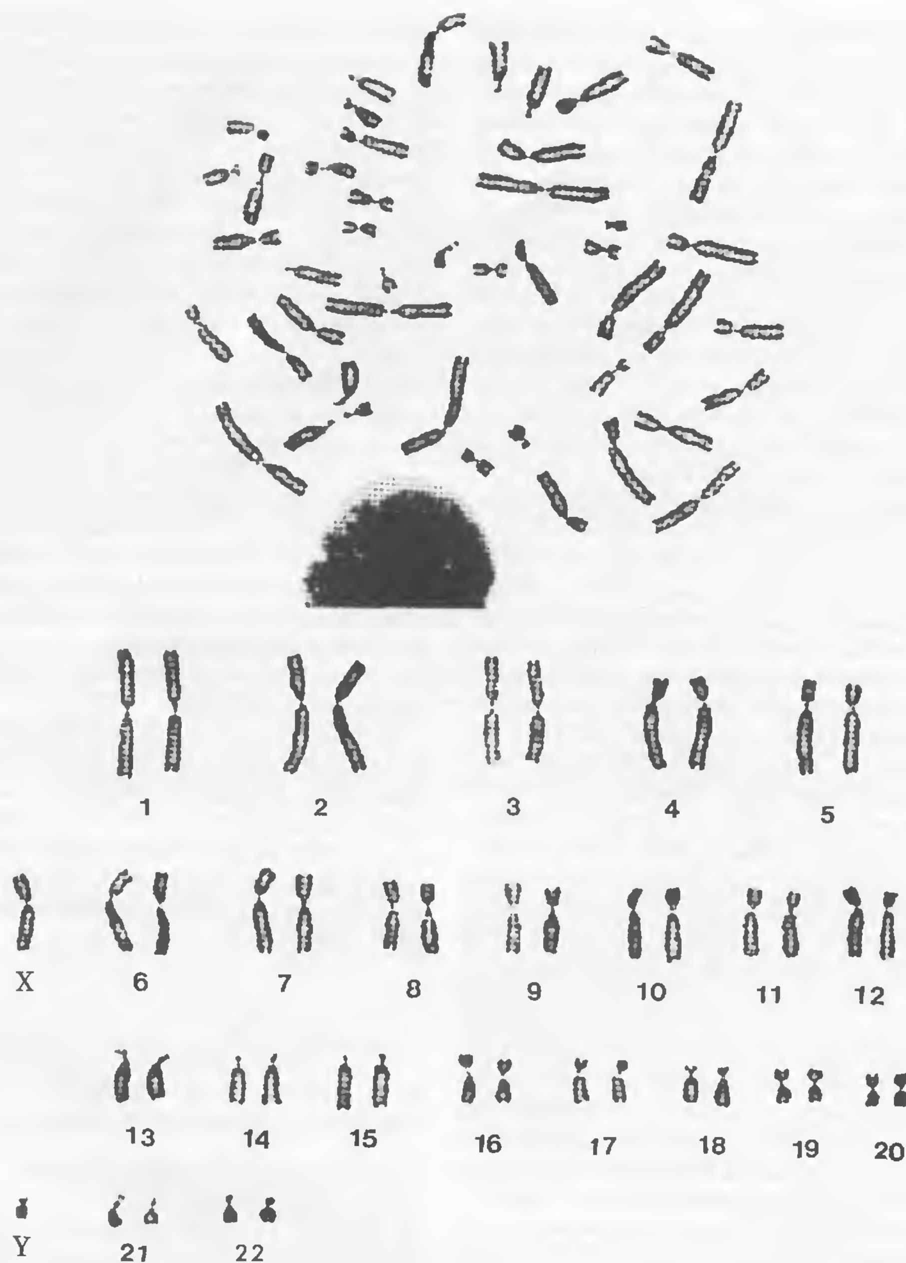


Fig. 8.22 Cariótipo humano. Acima, o aspecto de um preparado que se obtém achatando-se uma célula humana em metáfase. Embaixo, o cariótipo da célula em estudo, com os cromossomas ordenados de acordo com sua morfologia. (Cortesia de G. Gimenez-Martin.)

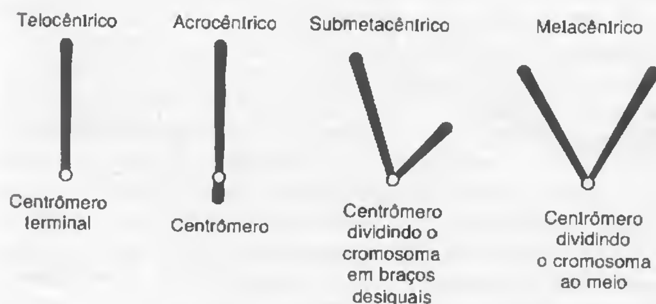


Fig. 8.23 Desenho ilustrando as diferentes posições que o centrômero pode ocupar nos cromossomas, fato que permite classificá-los em quatro tipos.

os. A Tabela 8.2 apresenta o número de cromossomas de algumas espécies. Na maioria das espécies que apresentam sexos separados, aparece um par de cromossomas cujos componentes são morfologicamente diferentes em um dos sexos. São os **cromossomas sexuais**, que variam de acordo com a espécie estudada. Os demais cromossomas são conhecidos como **autossomas**. Praticamente em todos os mamíferos e, entre eles, na espécie humana, o cariótipo apresenta dois cromossomas sexuais de morfologia diferente entre si, que recebem o nome de X e Y. No sexo feminino existem dois cromossomas X, portanto com morfologia semelhante. O sexo que apresenta dois cromossomas diferentes recebe o nome de **heterogamético** *(heteros*, diferente) por produzir gametas alternativamente com um ou com o outro cromossoma sexual, enquanto o outro sexo se denomina

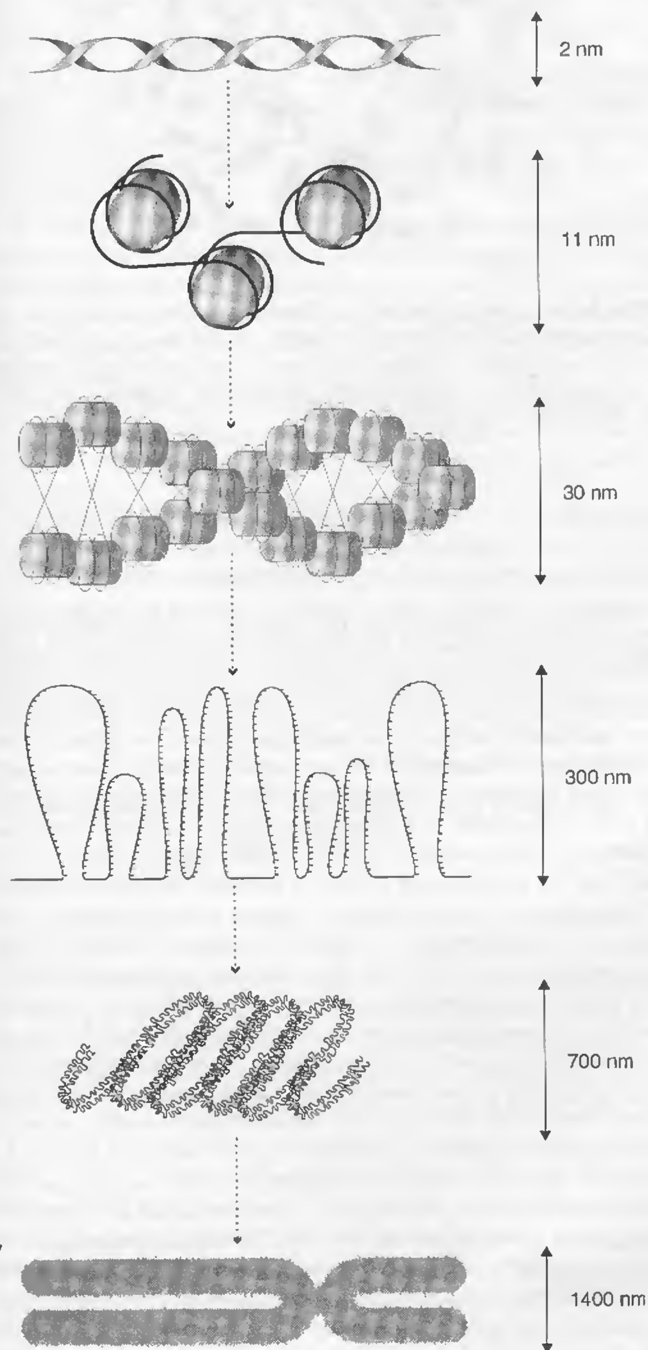


Fig. 8.24 Desenhos esquemáticos mostrando os diversos graus de condensação do DNA e proteínas associadas, para constituir os cromossomas mitóticos. De cima para baixo, aparece primeiro a hélice dupla de DNA (2 nm); depois, a associação com histonas, formando os filamentos de nucleosomas (11 nm e 30 nm). Esses filamentos se condensam ainda mais, para constituir filamentos de 300 nm e, depois, de 700 nm. Finalmente, o último desenho de baixo mostra um cromosoma metafásico, que é o grau máximo de condensação da cromatina.

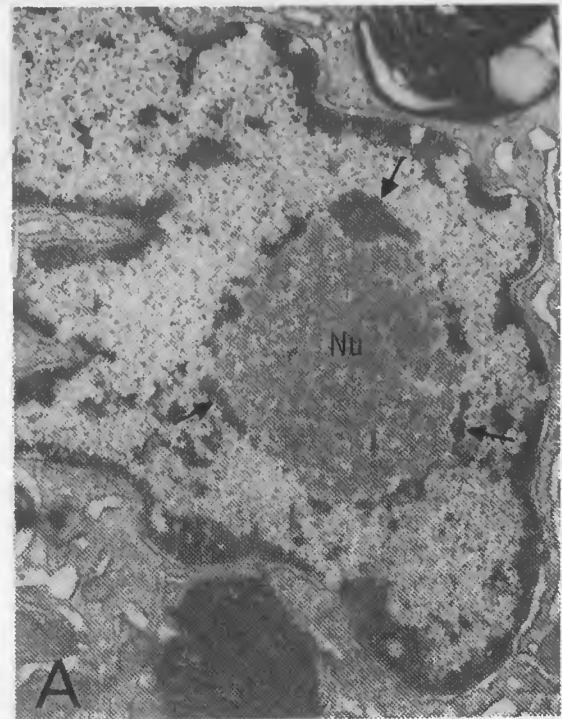




Fig. 8.25 Em **A**, eletromicrografia do núcleo de célula septal do pulmão mostrando um grande nucléolo (Nu) constituído por substância granular e apresentando ao redor a sua cromatina associada (setas). 25.000 ×. Em **B,** fotomicrografia de preparado total de cromosomas politênicos do inseto díptero *Telmatoscopus sp.* Observar os dois cromosomas com duas regiões organizadoras de nucléolos e seus respectivos nucléolos (Nu) nas extremidades. Coloração orceína lactoacética. (Cortesia de J. M. Amabis e L. C. Simões.)

Tabela 8.2 Número de cromossomas nas células diplóides de algumas espécies animais e vegetais

Nome científico e vulgar	Nº de cromossomas (2n)
Ascaris univalens (lombriga de cavalo)	2
Culex pipiens (mosquito)	6
Drosophila melanogaster (mosca de frutas)	8
Didelphis paraguayensis (gambá ou timbu)	22
Rattus rattus (rato)	42
Macaca mulatta (macaco)	42
Homo sapiens (homem)	46
Gorilla gorilla (gorila)	48
Capra hircus (cabra)	60
Equus caballus (cavalo)	66
Columba livia (pomba)	80
Haplopapus graciles	4
Cucumis sativus (pepino)	14
Carica papaya (mamão)	18
Solanum lycopersicum (tomate)	24
Avena sativa (aveia)	42
Solanum tuberosum (batata)	48
Gossypium hirsutum (algodão)	52
Saccharum officinarum (cana-de-açúcar)	80

homogamético (*homos*, igual) por produzir todos os seus gametas com o mesmo tipo de cromossoma sexual. Os mamíferos apresentam o sexo masculino heterogamético e, no entanto, nas aves o sexo heterogamético é o feminino. Nos répteis, encontram-se ambos os tipos de determinação sexual.

Estrutura dos cromossomas mitóticos

Cada cromossoma dos seres eucariontes é constituído por uma única e longa cadeia de DNA, disposta em dupla hélice e associada a proteínas. Esta cadeia se condensa muito durante a mitose, tornando os cromossomas, nesta fase, facilmente visíveis ao microscópio óptico. A Fig. 8.24 mostra a estrutura molecular dos cromossomas mitóticos.

Bandeamento cromossômico

Certas técnicas coram os cromossomas em subunidades definidas denominadas **bandas** (Fig. 8.26). Existem diversas técnicas de coloração, baseadas em princípios diferentes, que produzem bandas de distribuição, mas, quando se usa uma técnica, o número, posição e dimensão de cada banda são específicos e constantes para cada cromossoma. Esta especificidade permitiu identificar de maneira precisa os cromossomas humanos e melhorar sensivelmente a análise do cariótipo. Existem descritas, nos cromossomas metafásicos, 277 bandas e mais de 1.000 cromossomas profásicos, que aparecem nesta fase mais nitidamente visíveis que nos cromossomas metafásicos.

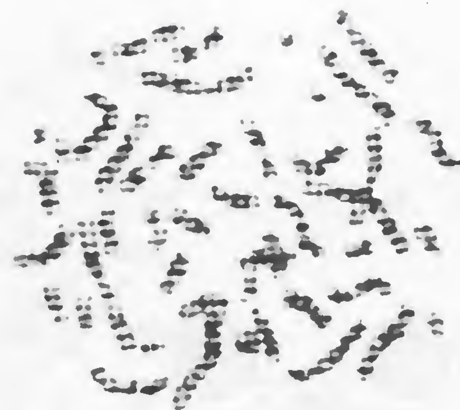


Fig. 8.26 Cariótipo humano obtido usando-se a técnica de bandeamento GTG (bandas G obtidas por tratamento pela tripsina e coloração com o corante de Giemsa). Cada cromossoma tem um bandeamento característico que permite sua identificação. 2.000 ×. (Cortesia de A. Wajntal.)

Sumário

Durante a divisão celular, a cromatina e o núcleo passam por alterações morfológicas e funcionais profundas. A mais notável é a transformação da cromatina interfásica, de forma filamentosa, mas com arranjo espacial aparentemente amorfo, nas unidades compactas e individualizadas: os cromossomas metafásicos. *Cada espécie tem um conjunto cromossômico característico, tanto pelo número quanto pela forma dos cromossomas. A esse conjunto dá-se o nome de* cariótipo. *O cromossoma, durante a divisão ou* mitose, *apresenta diversas estruturas visíveis ao nível da microscopia óptica. É formado por duas unidades longitudinais — as* cromátides *— ligadas entre si apenas por um ponto — o* centrômero *ou* constrição primária. *É nessa região que se prendem as fibras do fuso mitótico. A constrição primária divide cada cromátide em* braços, *que podem ser longos ou curtos, dependendo da posição do centrômero. Assim, os cromossomas podem ser telocêntricos (centrômero terminal), acrocêntricos (centrômero quase terminal), metacêntricos (centrômero na região mediana do cromossoma) e submetacêntricos (centrômero dividindo o cromossoma em braços desiguais). Existem, ainda, constrições secundárias que, quando subterminais, delimitam porções da extremidade da cromátide que foram denominadas de satélites. As regiões organizadoras dos nucléolos estão sempre associadas a constrições secundárias de cromossomas específicos. O número de cromossomas por espécie é constante e, normalmente, cada cromossoma existe em duplicatas nas células diplóides (2n) da grande maioria dos eucariontes. Células de certos tecidos, ou mesmo de algumas espécies, podem conter, entretanto, números múltiplos de genomas, sendo assim denominadas de poliplóides (4n, 8n etc.). No processo de condensação da cromatina interfásica para formar os cromossomas mitóticos, concorrem proteínas ácidas específicas. Neste processo, essas proteínas formam um esqueleto sobre o qual o filamento de cromatina (cromonema) enrola-se helicoidalmente, de uma extremidade à outra do cromossoma. No estágio da metáfase, a cromatina encontra-se no mais alto grau de condensação, da ordem de 10.000 × em relação à molécula isolada de DNA.*

Chama-se ciclo celular às modificações sofridas pela célula desde sua formação até sua divisão em duas células-filhas

O ciclo da divisão celular ou, mais abreviadamente, ciclo celular constitui o processo básico da gênese de novas células. O **ciclo celular** compreende os processos que ocorrem desde a formação de uma célula até sua própria divisão em duas células-filhas (Fig. 8.27).

O crescimento e a divisão celular devem compensar-se de tal modo que o ciclo duplicação-divisão permita um equilíbrio com a manutenção das características celulares essenciais. Por exemplo, a conservação do tamanho celular constante nas células-filhas obriga a que o crescimento interfásico se compense com a divisão mitótica. Os processos de reprodução celular que implicam um claro desequilíbrio a favor de um desses parâmetros não devem ser considerados como ciclo celular propriamente dito. É o caso da **ovogênese**, quando as células sofrem um gigantesco crescimento.

O estudo da divisão celular mostrou duas amplas etapas no ciclo celular: de um lado, aquela em que a célula se divide originando duas células descendentes e que é caracterizada pela divisão do núcleo ou **mitose** e a divisão do citoplasma ou **citocinese**. A etapa seguinte, em que a célula não apresenta evidentes mudanças morfológicas nucleares, é compreendida no espaço entre duas mitoses sucessivas e foi denominada **intérfase**.

A síntese de DNA tem lugar na fase S no ciclo celular

Ainda que a mitose constitua morfologicamente a etapa mais espetacular, é na intérfase que ocorre a duplicação dos componentes da célula-mãe. Esse processo pode ser estudado mediante o emprego de precursores radioativos utilizando-se métodos bioquímicos ou radioatográficos, ou mediante citofotometria. O emprego de precursores radioativos permitiu demonstrar que a duplicação do DNA nas células eucariontes está situada em determinado período da intérfase. Este descobrimento possibilitou a divisão da intérfase em três períodos, chamados G1, S e G2. A seqüência destas fases e sua duração média estão ilustradas nas Figs. 8.27 e 8.28 e na Tabela 8.3. Durante o período S ocorre a síntese do DNA, que leva à sua duplicação. A abreviatura G provém do termo inglês *gap* (intervalo). O período G1 é o intervalo entre o fim da mitose e o início da síntese de DNA, enquanto o período G2 é o intervalo entre o término da síntese de DNA (período S) e a próxima mitose.

Período G1

O período G1 é geralmente a fase do ciclo mais variável em duração (Tabela 8.3). Este período se caracteriza pelo reinício da síntese de RNA e proteínas, que estava interrompida durante a mitose (período M). Nos tecidos de rápida renovação, cujas células estão constantemente em divisão, o período G1 é curto; um exemplo é o epitélio que reveste o intestino delgado, que se renova no homem de três em três dias. Outro tecido com proliferação intensa é a medula óssea, onde se formam as hemácias e certos glóbulos brancos do sangue.

Todos estes tecidos são extremamente sensíveis a tratamentos que afetam a replicação do DNA (drogas ou radiações), razão pela qual são os primeiros lesados nos tratamentos pela quimioterapia do câncer ou na radioterapia em geral. Todos esses tratamentos afetam geralmente o metabolismo dos ácidos nucléicos (Fig. 8.29).

Outros tecidos não manifestam lesão tão rapidamente por apresentarem proliferação mais lenta, tal como ocorre na epiderme. Finalmente, há tecidos cujas células se reproduzem muito raramente, como o músculo liso, ou não proliferam em absoluto, como os neurônios (células nervosas). Diz-se que as células que não se dividem, permanecendo indefinidamente na intérfase, estão no período G0 (G-zero).

Período S

Durante o período S, a célula duplica, de modo semiconservador, seu conteúdo de DNA (Fig. 8.30). O desenvolvimento das técnicas de radioautografia permitiu situar o período S como uma etapa bem definida da intérfase. De fato, quando se colo-

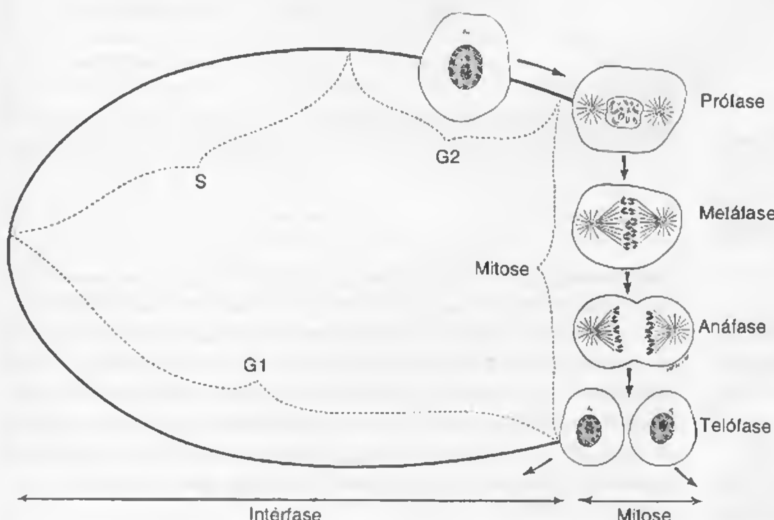


Fig. 8.27 Esquema do ciclo celular. À esquerda, a intérfase com as fases de G1, S e G2; à direita, a mitose. A duração da fase G1 é variável, pois depende da freqüência com que as células de um tecido se dividem. A fase G2 mais a mitose levam de 2 e meia a 3 horas. Os tempos são do trabalho de R. Young. (*J. Cell. Biol.*, *14*:357, 1962.)

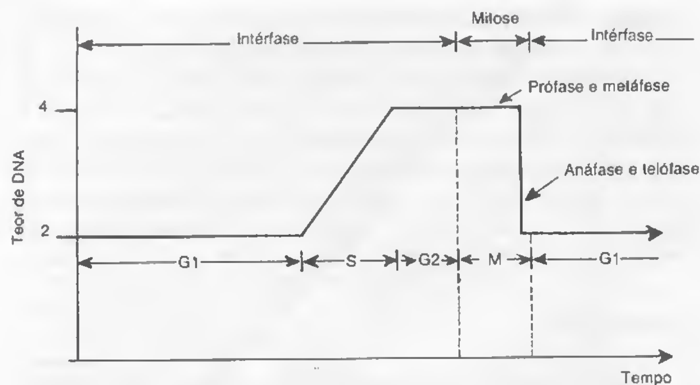


Fig. 8.28 Gráfico ilustrando a evolução do teor de DNA no núcleo de uma célula ao longo do ciclo celular. Na fase S ocorre a duplicação da quantidade de DNA, que permanece assim durante a fase G2. Apenas na mitose é que se restabelece o teor inicial.

Tabela 8.3 Duração das fases do ciclo celular, expressa em horas

Tipo	Mitose	G1	S	G2
Epitélio intestinal do rato	1	9	7	1 a 5
Meristema de raiz	2 a 6	5 a 15	10 a 30	3 a 9
Células osteoprogenitoras	3	25	8	2,5 a 3
Fibroblastos em cultivo	0,5 a 2	6	8	5

cam as células em presença de um precursor radioativo de DNA, como a timidina marcada com trítio, observa-se que ela se incorpora em células durante o período S. Alguns estudos mostraram uma pequena incorporação, ao longo do período não-sintético, provavelmente relacionada com processos de reparação do DNA que implicam certo nível de síntese. Uma análise detalhada da duplicação do DNA demonstrou que a incorporação de timidina não se dá ao mesmo tempo em todos os cromosomas e que, dentro de um mesmo cromosoma, existe um padrão determinado de ordem de síntese. Por isto se diz que a duplicação do DNA é assincrônica. Do exposto se conclui que, dentro do período S, os diversos segmentos dos cromosomas começam e terminam sua duplicação em momentos distintos.

Período G2

No período G2 têm lugar os preparativos necessários para a próxima mitose, mas nem todos são conhecidos. Sabe-se, porém, que a síntese de RNA e de proteínas iniciada no período G1 continua nos períodos S e G2 e se interrompe no período seguinte (período M ou mitose).

Após a divisão do núcleo ocorre a divisão da célula

A divisão celular se compõe da divisão ou repartição do material nuclear denominado no sentido estrito **mitose** e da **divisão citoplasmática** ou **citocinese** (*citos*, célula, e *cinesis*, movimento). No entanto, em sentido amplo, costuma-se identificar mitose como divisão celular. Este processo consiste essencialmente na condensação dos cromosomas que se tornam visíveis individualmente, aparecendo nitidamente os dois componentes idênticos de cada cromosoma — as **cromátides** —, e na distribuição às duas células-filhas do material gênico duplicado na intérfase anterior. Para facilitar seu estudo, a mitose é subdividida em etapas (Fig. 8.31).

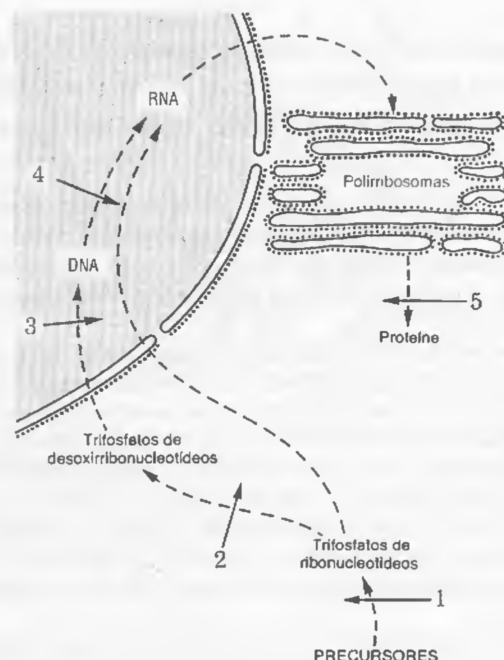


Fig. 8.29 Desenho ilustrando o mecanismo de ação de várias drogas antimitóticas. Em cima, à esquerda, o núcleo celular; à direita, o retículo endoplasmático rugoso. À custa de precursores presentes no citoplasma, a célula sintetiza os trifosfatos de ribonucleotídeos, que podem seguir duas vias. À esquerda, esses ribonucleotídeos são transformados em desoxirribonucleotídeos que, dentro do núcleo, são polimerizados em DNA. Na outra via, também endonuclear, os ribonucleotídeos são utilizados para a síntese dos RNA. Nos polirribosomas do retículo endoplasmático, os RNAs sintetizam as proteínas. As drogas que inibem a mitose podem agir em várias etapas do processo já aqui explicado. A etapa 1 (síntese dos ribonucleotídeos) é inibida pela 6-mercaptopurina, uma análoga das purinas, e pela dioxonorleucina e a azasserina, que impedem a ação do ácido fólico necessária à síntese das purinas. Na transformação dos ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos (etapa 2), agem como inibidores o arabinosilcitosídeo e a fluorouracila, que inibem enzimas que participam da síntese e polimerização dos trifosfatos de desoxirribonucleotídeos.

A mitomicina inibe a síntese do DNA (etapa 3), pois liga fortemente as duas hélices do DNA, impedindo-as de se abrirem para a replicação. Na etapa 4, a síntese de RNA é impedida pela actinomicina D, que se combina com as guaninas do DNA. Nessa mesma etapa age rifamicina, que inibe a RNA-polimerase.

A síntese protéica (etapa 5) é inibida pela puromicina, que compete com os aminoácidos na síntese dos polipeptídeos. Com exceção da rifamicina e da puromicina, os outros compostos citados são utilizados na quimioterapia do câncer. (Informações gentilmente cedidas pelo Prof. Ricardo R. Brentani e pelo Dr. Arnaldo Annes da Silva.)

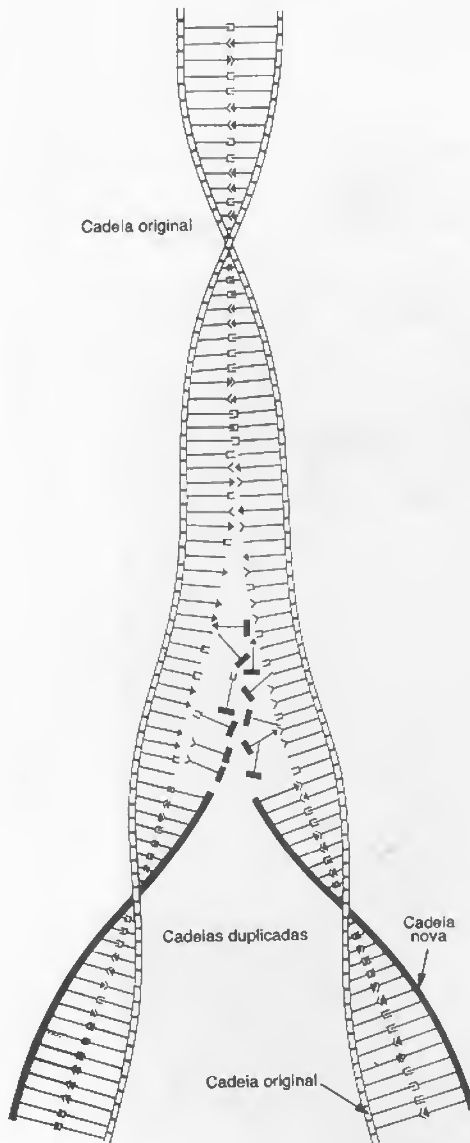


Fig. 8.30 Ilustração de como ocorre a duplicação semiconservadora da cadeia de DNA. Graças à abertura da cadeia dupla inicial e à posição dos nucleotídeos correspondentes em cada semicadeia, formam-se duas cadeias, cópias exatas da inicial. Em preto, as cadeias formadas de novo, a partir dos nucleotídeos; em branco, as cadeias originais.

A **prófase** (*pro*, primeiramente) caracteriza-se pela condensação gradual da cromatina interfásica, que termina formando uma série de bastonetes que se coram intensamente: os cromosomas, cada um formado por duas **cromátides**. Durante toda esta fase, os filamentos de cromatina que constituem os cromosomas se apresentam muito alongados, dando ao núcleo um aspecto de novelo. Os nucléolos vão-se desorganizando, enquanto os centríolos, já duplicados durante a fase S, emigram, um par para cada pólo da célula. Os microtúbulos do citoesqueleto se desmontam e suas subunidades são usadas para a formação de dois feixes de microtúbulos partindo dos dois pares de centríolos (Figs. 8.32 e 8.33).

A fase seguinte é a **prometáfase**, que se inicia de modo abrupto, pela desorganização do envoltório nuclear. Este envoltório se desfaz, originando vesículas membranosas, morfologicamente semelhantes às vesículas do retículo endoplasmático liso. Com a ruptura do envelope nuclear, os microtúbulos do fuso têm acesso aos cromosomas, que, agora, apresentam cinetocoros maduros na altura dos centrômeros. Alguns microtúbulos se prendem aos cinetocoros e passam a ser chamados de **microtúbulos dos cinetocoros**.

Na **metáfase** (*meta*, mais adiante), a condensação cromosômica atinge o máximo. Os microtúbulos, partindo dos centríolos localizados nos dois pólos celulares, se imbricam, formando o fuso mitótico. Devido aos microtúbulos inseridos nos cinetocoros, os cromosomas se dispõem numa placa, na zona correspondente ao equador da célula. Nos cromosomas metafásicos, as duas cromátides (filamentos de DNA) e o centrômero são mais facilmente visíveis, devido à condensação intensa dos dois filamentos de DNA.

Na **anáfase** (*ana*, para cima) ocorre a ruptura do equilíbrio metafásico com a divisão dos cromosomas e inicia-se a migração das cromátides, que agora poderão também ser chamadas de cromosomas-filhos, para os pólos. Durante esta migração, os cinetocoros vão à frente acompanhados pelo resto do cromosoma. A anáfase é caracterizada pela migração dos cromosomas para os pólos da célula. Ainda que o mecanismo da migração seja objeto de muita especulação, não há dúvida de que seu deslocamento depende dos microtúbulos, pois, quando estes são despolimerizados pela colchicina ou vimblastina, as mitoses estacionam na metáfase.

A **telófase** (*telos*, fim) inicia-se ao alcançarem os cromosomas-filhos os respectivos pólos, e caracteriza-se pelo desaparecimento dos microtúbulos dos cinetocoros, reconstrução dos núcleos e formação das células-filhas. A descondensação da cromatina, a reorganização dos nucléolos e a reconstituição do envoltório nuclear são os principais eventos de reconstrução nuclear, que se processam em sentido essencialmente inverso aos preparativos profásicos. Da mesma maneira se desmonta o sistema microtubular mitótico. Os novos envoltórios nucleares se formam pela fusão das vesículas originadas da desorganização nuclear da célula-mãe.

Nas células animais, a divisão do citoplasma deve-se à contração pela interação de filamentos de actina e miosina

A **citocinese** ou **divisão citoplasmática** tem início na anáfase e termina após a telófase com a formação de duas células-filhas. Na célula animal, forma-se uma constrição, ao nível da zona equatorial da célula-mãe, que vai progredindo e termina por dividir o citoplasma, formando-se as duas células-filhas, cada uma delas recebendo partes iguais do conteúdo citoplasmático.

A aplicação do método de imunofluorescência a células em mitose demonstrou a presença de miosina e actina na região do estrangulamento que ocorre entre as duas células-filhas na telófase (Fig. 8.34), o que explica, em termos de interação molecular, a constrição que leva à separação das duas células-filhas.

Na citocinese das células vegetais, a telófase coincide com a formação de um tabique ao longo do equador da célula-mãe. Essa formação denomina-se **placa celular** e resulta da fusão

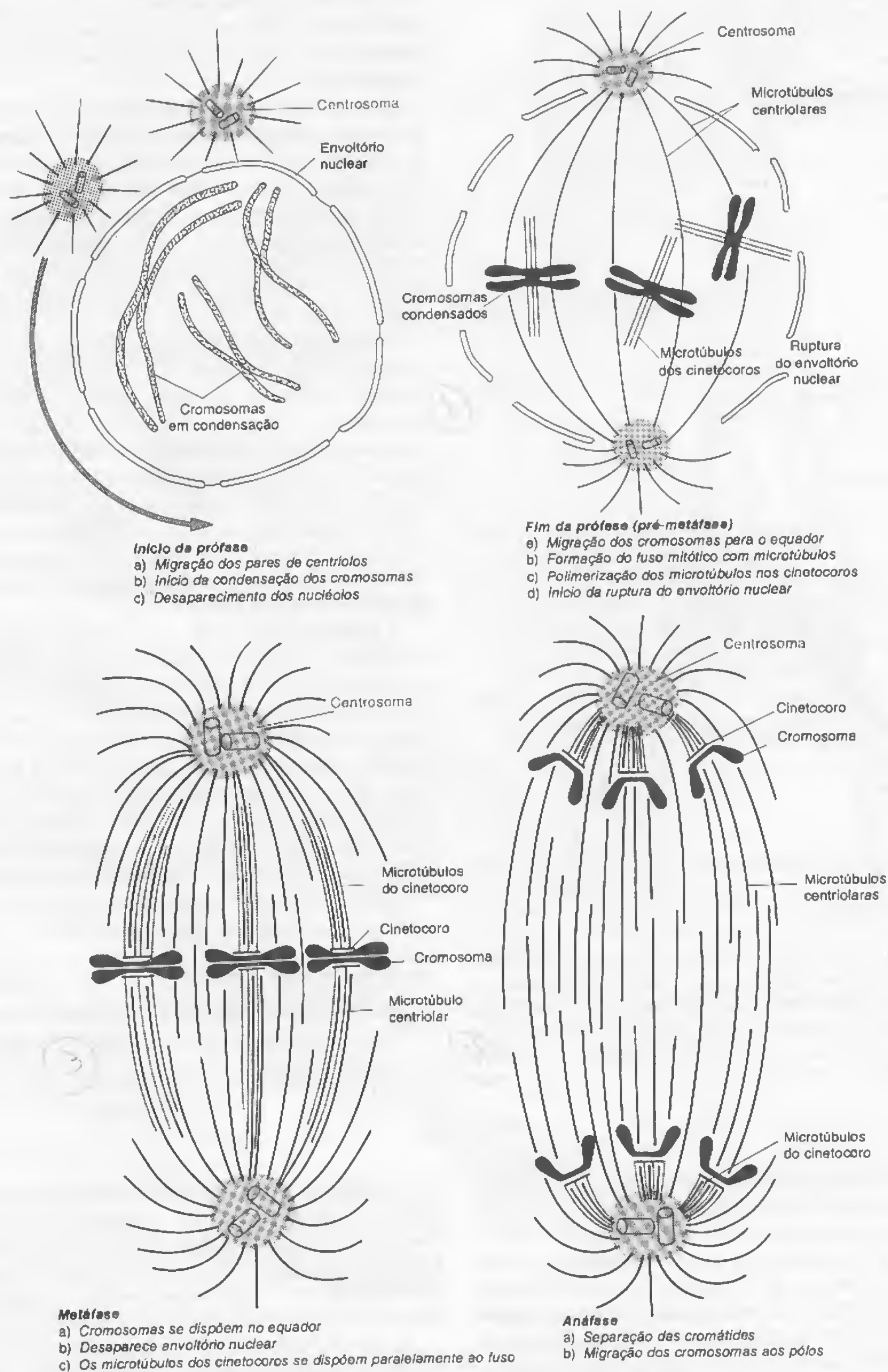


Fig. 8.31 Desenhos esquemáticos da prófase, metáfase e anáfase, explicando as principais ocorrências nessas fases da mitose.

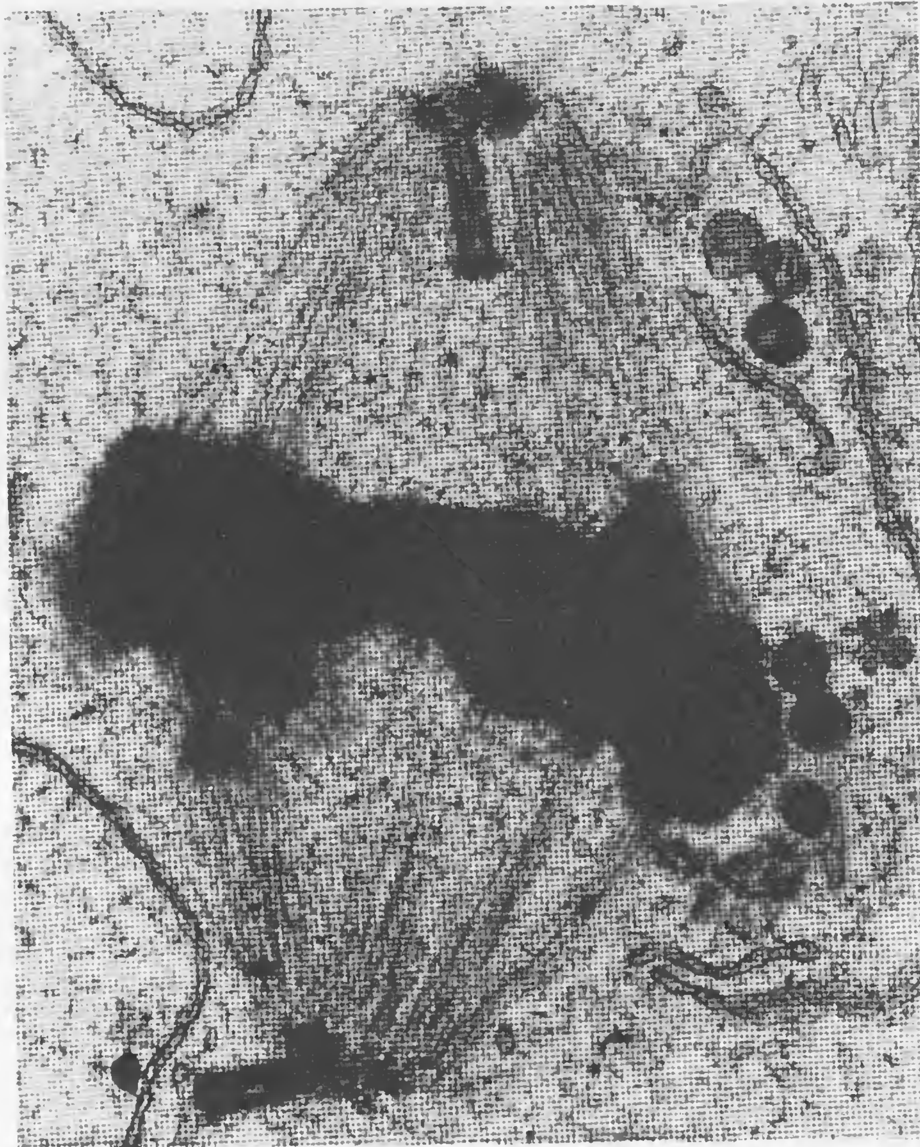


Fig. 8.32 Corte longitudinal de espermatócito em metáfase. Observar os dois centríolos de cada pólo, os microtúbulos formando o fuso mitótico e os cromosomas agrupados no equador da célula. Aos lados, mitocôndrias e retículo endoplasmático liso. 30.000 ×. (Cortesia de R. McIntosh.)

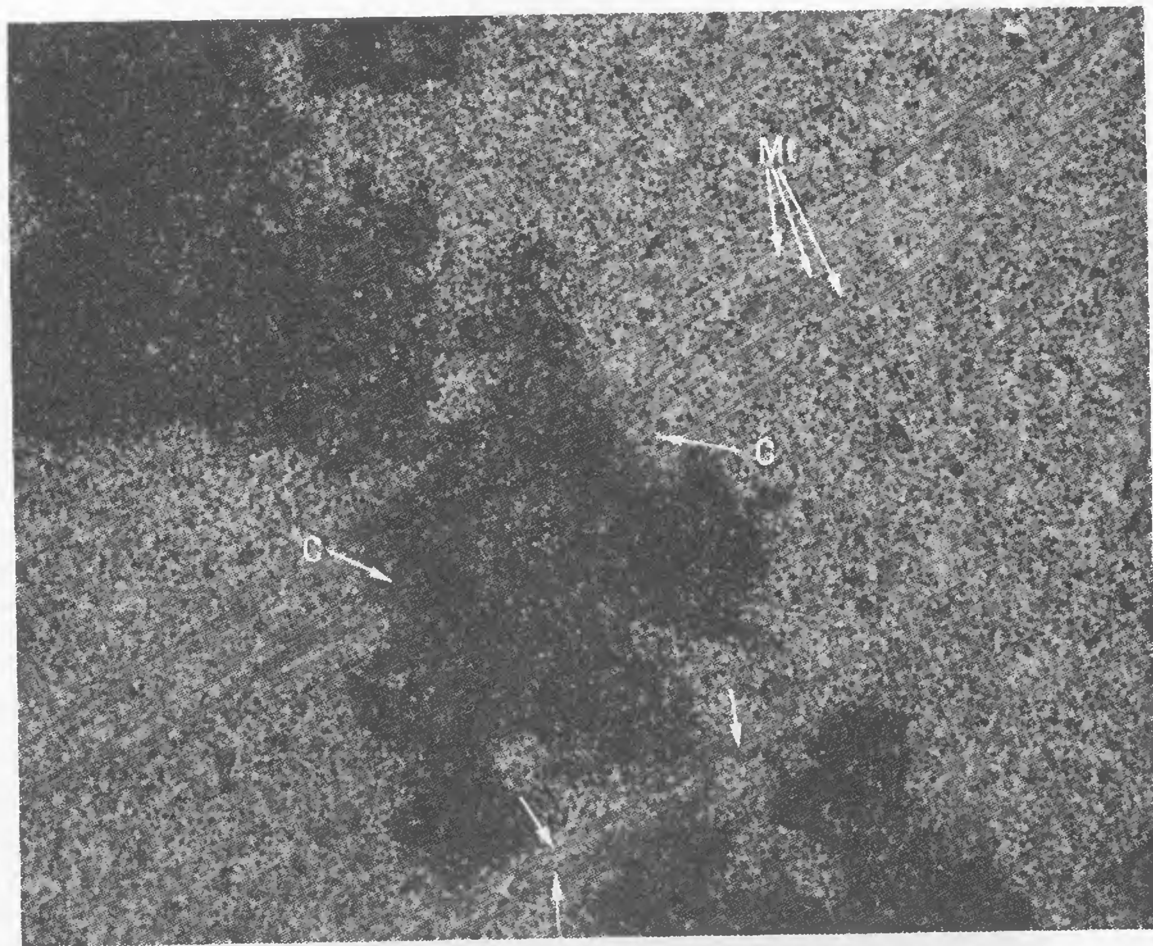


Fig. 8.33 Cromosomas de célula humana em mitose. Observe a estrutura densa dos cromosomas comparada com o citoplasma. Feixes de microtúbulos (Mt) inserem-se nos centrômeros. Embaixo (setas), um feixe de microtúbulos que atravessam a placa de cromosomas e ligam os centríolos dos dois pólos. 1.000.000 ×. (Cortesia de R. McIntosh.)

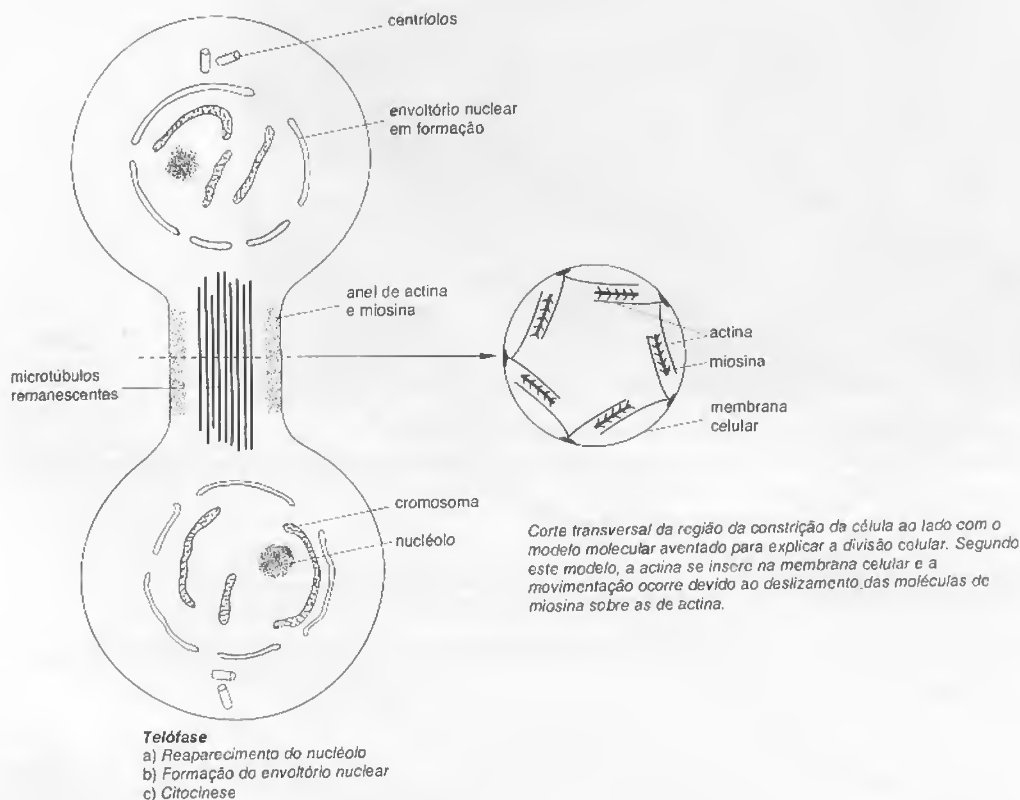


Fig. 8.34 Desenho esquemático da telófase, que leva ao término da mitose. O corte transversal mostra a constrição que aparece, durante a citocinese, como resultado da interação das proteínas contráteis actina e miosina. Esta constrição avança até a divisão da célula.

de vesículas procedentes do aparelho de Golgi. A membrana das vesículas formará a nova membrana plasmática desta região.

No período mitótico, a atividade sintética da célula é baixa, principalmente porque a condensação da cromatina bloqueia a transcrição do DNA.

O ciclo celular é influenciado pelos fatores de crescimento

A possibilidade de sincronização de uma cultura de microrganismos ou de células *in vitro* facilitou o estudo dos acontecimentos moleculares que ocorrem durante o ciclo celular. Isto foi conseguido colocando-se a cultura em uma determinada temperatura ou em presença de um tratamento químico, processos estes que bloqueiam o ciclo celular numa determinada fase. Por meio destes artifícios, é possível conseguir que uma cultura cujas células se encontram nos diferentes períodos (G1, S, G2 ou mitose) prossiga o seu ciclo até acumular suas células na fase bloqueada. Ao eliminar as condições de inibição restaurando as condições normais de cultura, todas as células continuam o ciclo a partir da mesma fase. Portanto, nestas culturas é possível estudar os fenômenos bioquímicos que ocorrem em cada período.

O ciclo celular de células de mamíferos é influenciado por substâncias que foram denominadas de **fatores de crescimento**. O primeiro desses fatores descoberto foi um peptídeo que estimula o crescimento de nervos, mais especificamente produz uma hiperplasia de gânglios simpáticos de embriões de galinha. Esse fator, denominado de **fator de crescimento do nervo** (NGF — *nerve growth factor*), foi, inicialmente, extraído de culturas de células de camundongo. Posteriormente, outros fatores peptídicos foram descobertos, tais como o **fator de crescimento epidérmico (EGF** — *epidermal growth factor*), o **fator de crescimento de fibroblastos (FGF** — *fibroblast growth factor*), o **fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF** — *platelet derived growth factor*) e o **fator de crescimento semelhante à insulina (IGF** — *insulin-like growth factor*). A proliferação das células é controlada pela concentração dos fatores de crescimento que agem fundamentalmente em duas fases do ciclo celular. Em células que estão em proliferação, alguns dos fatores (PDGF, FGF) agem a partir de G2 e M, estimulando as células a entrarem em G1 (após a mitose), continuando, então, o ciclo de divisão. Se não forem estimuladas nessa etapa do ciclo, as células entram em estágio denominado de G0, onde a proliferação é interrompida. As células que estão em G0, se estimuladas pelos fatores de crescimento, retornam à atividade proliferativa entrando novamente em G1 → S → G2 → M. Os fatores PDGF e FGF tornam as células em G0 "competentes" para deixar este estágio. Na presença de EGF, as células "progridem" nas primeiras etapas de G1 e, na presença de IGF, "progridem" mais ainda em G1, de maneira que, atingindo uma etapa no final do período G1, tornam-se comprometidas com a divisão, avançando, irremediavelmente, para S → G2 → M. Assim, FGF e PDGF são fatores de competência, enquanto EGF e IGF são fatores de progressão. Eles agem, portanto, sinergisticamente para promover a transição G0 → G1 → S → G2 → M.

A maioria dos tecidos sofre um constante processo de renovação graças à contínua proliferação e morte das células. São exceções o tecido nervoso e o tecido muscular estriado, cujas células não se renovam. A velocidade de renovação das células varia muito de um tecido a outro, podendo ser rápida, como no caso do epitélio intestinal e da epiderme, ou lenta, como no caso do fígado. Apesar disso, em determinadas condições o ritmo de reprodução de um tecido pode alterar-se. Retirando-se de um vertebrado uma porção de pele ou de fígado, observa-se que, depois de um curto período, inicia-se nestes tecidos uma ativação das mitoses que perdura até terminar a reparação ou substituição do tecido retirado. A este fenômeno se dá o nome de **regeneração**, e seu estudo permite analisar certos fatores que controlam a divisão celular.

Parece que a atividade mitótica de alguns tecidos é inibida por substâncias de natureza protéica chamadas **calonas**. As calonas são normalmente produzidas pelos tecidos e sua presença impede a proliferação excessiva das células, regulando o ritmo de crescimento dentro dos limites normais. Foi demonstrado que, em casos de extirpação de parte de um órgão, como, por exemplo, do fígado, diminui a produção de calonas específicas, com o conseqüente aumento das mitoses nas células do fígado. À medida que a regeneração se processa e com o conseqüente aumento de células, aumenta a produção de calonas e, como resultado, reduz-se paralelamente a proliferação. As calonas provavelmente também explicam o fenômeno chamado **hipertrofia compensadora**, pela qual, quando se extirpa um dos órgãos de um par, o outro sofre um processo de crescimento seguido de um aumento de sua atividade fisiológica. Este fenômeno foi observado e bem estudado no rim. Outros fatores controlam a divisão celular de certos órgãos; é o caso, por exemplo, da ação de certos hormônios sobre **órgãos-alvo**. Quase todos esses hormônios atuam aumentando a atividade do ciclo celular. São exemplos o hormônio tireotrófico procedente da hipófise, que ativa a proliferação das células da glândula tireóide; a testosterona, que aumenta a proliferação dos epitélios da vesícula seminal e da próstata; e os estrógenos, que atuam sobre os epitélios do útero e da vagina.

Qualquer substância que afete a síntese de DNA, RNA ou proteínas, assim como a formação do fuso, deve inibir a proliferação, e a estas drogas se dá o nome genérico de **agentes cicloativos**. Vários destes compostos foram separados ou sintetizados, e alguns deles foram estudados a fundo. Uns poucos têm aplicação na quimioterapia de tumores, em especial de tumores de crescimento rápido, pois, quanto mais intensa é a proliferação, maior a sensibilidade das células a estes agentes. Infelizmente, todas estas drogas são armas de dois gumes, pois afetam tanto as células normais quanto as tumorais em proliferação ativa. Assim é que o epitélio intestinal, as células da medula óssea e as produtoras de cabelo são particularmente afetadas por este tratamento. Isto explica as alterações intestinais, do sangue e a queda do cabelo observadas freqüentemente nos doentes tratados com estas drogas. As drogas que atuam sobre o fuso mitótico são principalmente a colchicina ou seu derivado colcemide, de melhor ação terapêutica, e a vimblastina. A Fig. 8.29 ilustra como atuam algumas drogas que afetam o metabolismo dos ácidos nucléicos e das proteínas.

Sumário

A alternância dos estágios de intérfase e de divisão na vida das células corresponde ao chamado ciclo celular, *que é o pro-*

cesso básico de gênese de novas células. Compreende os fenômenos que ocorrem desde a formação de uma célula até sua própria divisão em duas células-filhas. A intérfase representa o período compreendido entre duas divisões. Três fases consecutivas são geralmente descritas na intérfase: G1, S e G2. Em G1, a fase mais variável em duração, as células apresentam intensa atividade de síntese de RNA e de proteínas, e nela ocorre um marcante aumento do citoplasma das células recém-formadas. No período S, a célula duplica seu conteúdo de DNA, e, em G2, têm lugar os preparativos para a próxima mitose. Nesse período, ocorre discreta síntese de RNA e de proteínas que são essenciais para a mitose. A duplicação do DNA, na fase S, se faz de modo semiconservador, ou seja, as cadeias da dupla-hélice de DNA se separam e, sobre cada uma delas, uma nova cadeia é sintetizada, refazendo a hélice dupla. Esta duplicação inicia-se em numerosos pontos ao longo da molécula de DNA e progride por curtos trechos até encontrar novas regiões em duplicação. Esses segmentos, ou unidades de duplicação, são denominados de réplicons. *Tendo passado pelas fases da intérfase, o núcleo entra em um processo de divisão ou* mitose. *A mitose é dividida, didaticamente, em fases que descrevem as principais alterações morfológicas e a movimentação dos cromosomas durante o processo. Na* prófase, *os cromosomas iniciam seu processo de condensação, os nucléolos desaparecem e formam-se feixes de microtúbulos a partir dos centríolos. A fragmentação do envoltório nuclear marca, de modo abrupto, o início da* prometáfase, *quando se estabelece o contato entre microtúbulos que partem dos centríolos e os cinetocoros. Na* metáfase, *a condensação dos cromosomas atinge o maior grau, alguns microtúbulos provenientes dos centríolos se imbricam com outros, formando o fuso mitótico, e os cromosomas dispõem-se numa placa na zona equatorial da célula. Na fase seguinte,* anáfase, *os centrômeros de cada cromosoma se dividem longitudinalmente, e as cromátides-irmãs (agora cromosomas-filhos) são movidas para os pólos opostos, com a participação das fibras do fuso. Na* telófase, *etapa em que os cromosomas-filhos chegam aos pólos, ocorre a reconstituição dos núcleos, com a descondensação dos cromosomas, a reorganização dos nucléolos e a desagregação do fuso mitótico. Após a reconstituição dos núcleos-filhos (fim da mitose propriamente dita), completa-se a divisão do citoplasma (*citocinese*), originando, assim, duas células-filhas independentes. A duração do ciclo celular é variável quando se consideram células de diferentes tecidos de um organismo, ou quando se consideram organismos ou espécies diferentes. Em um mesmo organismo, a principal causa dessa variação é a duração do período inicial da intérfase: o G1. As fases S e G2 e a própria mitose têm duração mais ou menos constante para as células de diferentes tecidos de uma mesma espécie. Tecidos proliferativos apresentam células com ciclo celular curto, ao contrário de tecidos não-proliferativos, cujas células apresentam ciclo celular longo. Além da taxa normal de renovação celular de cada tecido, os processos drásticos de regeneração, quando ocorre perda de porções de algum tecido ou órgão, alteram o ritmo normal de divisão das células, com ativação das mitoses e, portanto, com diminuição da duração do ciclo celular. Nesses processos regenerativos, diminui a produção de certas substâncias, por exemplo, as calonas, que são inibidoras da atividade mitótica. A proliferação é também controlada por substâncias ativadoras, os chamados* fatores peptídicos de crescimento. *Tais substâncias, quando presentes, induzem as células a entrar nas etapas de G1 que as conduzem, inexoravelmente, às fases S, G2 e à mitose.*

A meiose torna possível a reprodução sexuada e favorece a evolução das espécies

Na mitose, as células-filhas apresentam o mesmo número de cromosomas (n = número de cromosomas) que a célula-mãe (2n = célula diplóide). Na formação dos gametas (espermatozóides e óvulos), isto não ocorre, já que os gametas só apresentam metade do número de cromosomas encontrado na espécie (n = célula haplóide). O processo que reduz à metade o número de cromosomas recebeu o nome de **meiose** (*meion*, menor). Posteriormente, com o auxílio da citofotometria, observou-se, como era de supor, que os gametas contêm também a metade do teor de DNA constante para cada espécie. Portanto, a meiose é o processo que origina as **células germinativas** ou **gametas**, que contêm a metade do número de cromosomas característico da espécie. Em essência, consiste a meiose em duas divisões celulares sucessivas, com duplicação do DNA apenas uma vez, no período S que precede a primeira divisão (Fig. 8.35).

O período S, de síntese de DNA, que precede a meiose, geralmente tem duração mais longa do que o período S que precede a mitose. Em continuação à duplicação do DNA, inicia-se a **prófase da primeira divisão meiótica, ou prófase I**, que é muito demorada, em comparação com a prófase da mitose. Por exemplo, na mulher, todos os ovócitos existentes nos ovários estão na prófase I da meiose, desde o nascimento. Como não há produção de ovócitos após o nascimento, a maioria destas células permanece na prófase I por várias décadas. É durante as fases da prófase I que ocorrem fraturas e trocas de segmentos dos cromosomas homólogos, fenômeno este chamado **permutação** (*crossing over*). Este fenômeno tem grande importância genética, pois consiste basicamente na troca de DNA de um cromosoma de origem materna com outro de origem paterna (Fig. 8.31). Isto tem como conseqüência a possibilidade de muitas combinações gênicas, que emprestam às espécies uma grande diversidade durante o processo de evolução. A prófase I é, geralmente, dividida nas seguintes fases: **leptóteno**, **zigóteno**, **paquíteno**, **diplóteno** e **diacinese**. Em seguida vem a metáfase da primeira divisão mitótica, ou **metáfase I**.

Durante o **leptóteno**, os cromosomas se tornam, gradualmente, visíveis ao microscópio óptico. Embora se saiba, pela citofotometria e pela radioautografia, que os cromosomas já se duplicaram, o microscópio óptico não mostra qualquer sinal de duplicação, pois as duas cromátides que formam cada um desses cromosomas não são visíveis ao microscópio óptico. Porém, o microscópio eletrônico revela claramente que cada cromosoma é constituído por um par de cromátides. O microscópio eletrônico mostra, além disso, que existe um material protéico filamentoso, unindo as duas cromátides de cada cromosoma.

Os cromosomas duplos continuam sua condensação durante o leptóteno até que ficam prontos para iniciar o processo chamado **sinapse**, que tem sido comparado à união das duas metades quando se fecha um zíper. O processo sináptico tem lugar na fase denominada **zigóteno**, que é a segunda fase da prófase I. Esse processo une os cromosomas homólogos, sendo pouco conhecidos os mecanismos moleculares que possibilitam que os cromosomas homólogos se reconheçam e se prendam pelas sinapses, alinhando-se lateralmente de maneira tão precisa. A microscopia eletrônica mostrou que as sinapses cromosomais são devidas à formação de uma estrutura complexa denominada **complexo sinaptonêmico (CS)**. Cada complexo sinaptonêmico é

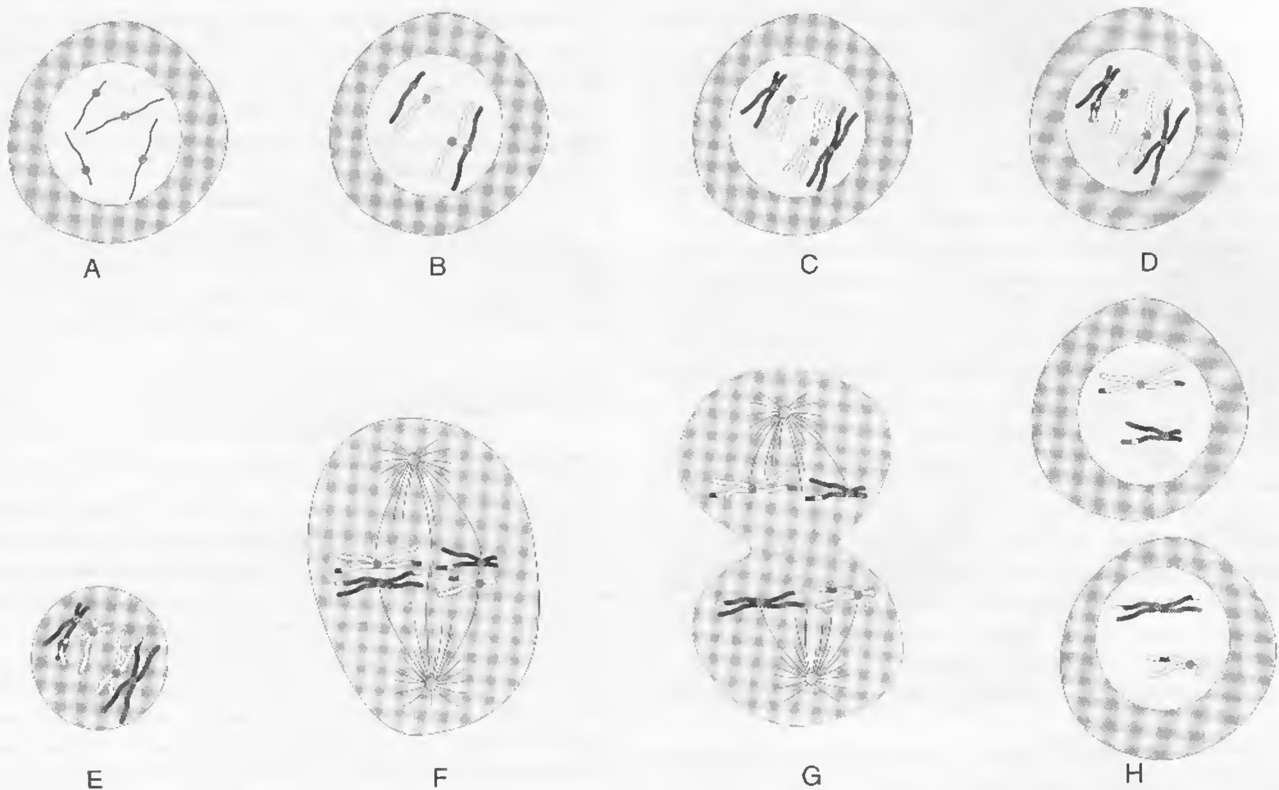




Fig. 8.35 Desenho ilustrando a meiose numa célula hipotética com dois pares de cromossomas. A síntese de DNA ocorre apenas uma vez, antes da prófase da meiose I. A célula indicada pela letra **A** já está nessa prófase. As duas células marcadas **H**, derivadas da meiose I, tem número diplóide de cromossomas. A meiose II representa a divisão das duas células mostradas em **H**. Como não houve síntese de DNA antes dessa divisão, as quatro células indicadas pela letra **K** são haplóides. Observe que, durante a meiose I, houve troca de segmentos entre cromossomas homólogos, o que contribui para a variação genética dos seres sexuados. Em resumo, uma célula diplóide (**A**) deu origem a quatro células haplóides (**K**) e, no processo, houve troca do material genético entre os cromossomas.

constituído por três fibras grossas, paralelas entre si e ao eixo do cromosoma, e as fibras grossas laterais se unem à localizada no centro por intermédio de filamentos. Cada cromátide está ligada a uma das fibras grossas laterais, mantendo a união entre os cromosomas do par. É possível que o complexo sinaptonêmico tenha algum papel na troca de segmentos de DNA entre os cromosomas homólogos, mas é possível também que essa troca de DNA tenha começado na fase de leptóteno. Neste caso, o complexo sinaptonêmico participaria, mas não seria essencial para as trocas de genes que podem ocorrer na prófase I.

O conjunto constituído pelos cromosomas homólogos unidos pelo complexo sinaptonêmico é chamado de **cromosoma bivalente** ou uma **tétrade**. É bivalente porque contém dois cromosomas unidos, e é uma tétrade porque é formado por quatro cromátides. Quando o processo de formação sinaptonêmica se completa, isto é, quando todos os homólogos estão unidos por complexos sinaptonêmicos em toda a sua extensão, começa a terceira fase da prófase I, que é o **paquíteno**. O paquíteno dura alguns dias ou semanas, ao contrário das fases anteriores, o leptóteno e o zigóteno, que são mais breves e se realizam em apenas algumas horas. Durante todo o paquíteno, os cromosomas homólogos permanecem unidos pelo complexo sinaptonêmico. Nesta fase, o complexo sinaptonêmico mostra, ao microscópio eletrônico, corpos elétron-densos medindo cerca de 100 nanômetros e dispostos a intervalos regulares. Segundo alguns pesquisadores, estes corpos facilitariam as recombinações genéticas.

A fase seguinte é o **diplóteno**, caracterizado pelo desaparecimento do complexo sinaptonêmico e pela tendência de separação que se observa entre os cromosomas homólogos de cada par bivalente. Esta tendência fica mais evidente, porque os cromosomas homólogos permanecem ligados em certos locais, denominados **quiasmas**. Os quiasmas são locais onde, geralmente, ocorre troca de genes entre os cromosomas homólogos, embora a relação entre quiasma e troca de DNA não seja absoluta. Na formação dos gametas femininos ou ovócitos, o diplóteno é uma fase muito longa e nela ocorre um aumento de volume do ovócito. Trata-se, portanto, de uma fase de intensa atividade metabólica, o que explica a observação de que, no diplóteno, os cromosomas se tornam descompactados para permitir a transcrição de certos genes. Em diversas espécies, os espermatócitos e ovócitos, durante a fase de diplóteno, apresentam cromosomas com uma configuração muito característica e que são denominados *lampbrush chromosomes* (v. Cap. 9).

A última fase da prófase I chama-se **diacinese** e consiste na preparação dos cromosomas para a etapa seguinte da divisão meiótica, que é a metáfase I. Durante a diacinese têm lugar o desaparecimento dos nucléolos, a ruptura do envelope nuclear em pequenas vesículas e o movimento das tétrades para a placa equatorial da metáfase I. Durante a diacinese, os quiasmas são mantidos, o que é importante para a distribuição correta dos cromosomas durante a divisão. A falta de quiasmas pode levar a uma segregação incorreta dos cromosomas homólogos, causando doenças hereditárias.

Durante a metáfase I, a anáfase I e a telófase I, cada cromosoma continua duplo, isto é, com duas cromátides. É fácil ver, durante a anáfase, que os cromosomas que estão em movimento para os pólos celulares são constituídos por duas cromátides, presas por seus centrômeros. O estágio entre as duas divisões meióticas é chamado **intercinese** e, nos animais, as células neste estágio são os espermatócitos secundários e os ovócitos secundários. As células na intercinese caracterizam-se pela presença de um número haplóide de cromosomas, porém uma quantidade diplóide de DNA, pois cada cromosoma é duplo.

Em seguida vem a segunda divisão meiótica, que dá origem a células com o número haplóide de cromosomas e quantidade haplóide de DNA. Na metáfase II, os cinetocoros das cromátides-irmãs se orientam para pólos opostos da célula e se prendem às fibras dos fusos das extremidades opostas, assegurando a distribuição correta dos cromosomas maternos e paternos. Na anáfase II ocorre a separação das cromátides-irmãs, possibilitando que elas migrem para pólos opostos da célula. A telófase II é a última etapa da segunda divisão meiótica, dando origem a células que são haplóides tanto no número de cromosomas, como no teor de DNA, embora sejam de tamanhos diferentes.

Sumário

As células da linhagem germinativa multiplicam-se por divisões mitóticas de modo semelhante às células somáticas, como foi visto anteriormente. No entanto, quando entram nos processos da gametogênese, etapa final de seu programa de desenvolvimento, a divisão adquire aspectos especiais. Essa divisão, a meiose, *consiste basicamente em duas divisões nucleares, com síntese de DNA apenas uma vez, antes da primeira divisão. As células-filhas resultantes têm a metade do número de cromosomas e a metade da quantidade de DNA que as células-mãe. A* prófase *meiótica da primeira divisão é especial, pois nela ocorre o emparelhamento dos cromosomas homólogos que podem trocar pedaços entre si, fenômeno denominado de* permutação *ou* crossing over. *Os cromosomas homólogos permanecem unidos em alguns pontos* (quiasmas), *resultantes das trocas havidas na permutação, até a* metáfase. *Na anáfase, como não ocorre divisão dos centrômeros, as duas cromátides que constituem cada cromosoma se mantêm unidas. Com isto, há redução do número de cromosomas por célula, embora a quantidade de DNA seja igual ao valor diplóide original, pois cada cromosoma está duplicado. A segunda divisão ocorre geralmente logo após o final da telófase da primeira divisão e é semelhante a uma mitose, com separação das cromátides-irmãs após divisão dos centrômeros. Com isto, cada célula-filha terá metade do número de cromosomas e, também, a metade da quantidade de DNA que existia nas células-mãe. A meiose, formando células com metade dos cromosomas típicos da espécie, permite que, com a união dos gametas haplóides (n), se formem novos indivíduos com os 2n cromosomas característicos da espécie. A mistura de cromosomas paternos e maternos que ocorre durante as duas divisões meióticas e, também, a troca de genes na permutação aumentam a variabilidade genética dos indivíduos nas populações. A existência de variabilidade genética é um dos requisitos fundamentais para que haja evolução.*

Bibliografia

BASKIN, Y. Mapping the cell's nucleus. *Science, 268*:1564, 1995.

BEREZNEY, R. The nuclear matrix. A structural milieu for the intranuclear attachment and replication of eucaryotic DNA. *In*: Schweiger, H. G. (ed.) *International Cell Biology*, p. 214. Springer-Verlag, 1981.

BLACKBURN, E. H. and SZOSTAK, J. W. The molecular structure of centromeres and telomeres. *Ann. Rev. Biochem.*, *53*:163, 1984.

BLAU, H. M. Hierarchics of regulatory genes may specific mammalian development. *Cell, 53*:673, 1988.

BOY de la TOUR, E. and LARMMLI, U. K. The metaphase scaffold is helically folded: sister chromatids have predominantly oposite helical handedness. *Cell, 55*:973, 1988.

BRAWERMAN, G. Determinants of messenger RNA stability. *Cell, 48*:5, 1987.

BREITBART, R. E.; ANDREADIS, A. and NADAL-GINARD, B. Alternative splicing: a ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. *Ann. Rev. Biochem., 56*:467, 1987.

CIEJEK, E. M.; TSAI M-J; O'MALLEY, B. W. Actively transcribed genes are associated with the nuclear matrix. *Nature, 306*:607, 1984.

DARNELL, J. E. RNA. *Sci. Am., 253*(4):68, 1985.

DARNELL, J. E. The processing of RNA. *Sci. Am., 249*(4):72, 1983.

DARNELL, J.; LODISH, H. & BALTIMORE, D. *Molecular Cell Biology*, 2nd ed. Sci. Am. Books, 1990.

DAVIS L. I. The nuclear pore complex. *Ann. Rev. Biochem., 64*:865, 1995.

DINGWALL, C. and LASKEY, R. The nuclear membrane. *Science, 258*:942, 1992.

EARNSHAW, W. C. *et al.* Topoisomerase II is structural component of mitotic chromosome scaffolds. *J. Cell Biol., 100*:1706, 1985.

FAWCETT, D. *The Cell*. Saunders. 2nd ed., 1981.

FAWCETT, D. W. & CHEMES, H. Changes in distribution of nuclear pores during differentiation of the male germ cells. *Tissue Cell, 11*:147, 1979.

FELDHERR, C. M. (ed.). *Nuclear Trafficking*. Acad. Press, 1992.

GEIDUSCHEK, E. P. Transcription by RNA polymerase III. *Ann. Rev. Biochem., 57*:873, 1988.

GERACE, L.; BLUM, A. & BLÖBEL, G. Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. Interphase and mitotic distribution. *J. Cell Biol., 79*:546, 1978.

MARMUR, J. DNA strand separation, renaturation, and hybridization. *Trends. Biochem. Sci., 19*:343, 1994.

NEWMEYER, D. D. and FORBES, D. J. Nuclear import can be separated into distinct steps *in vitro*: nuclear pore binding and translocation. *Cell, 52*:641, 1988.

TIJAN, R. Molecular mechanics that control genes. *Sci. Am.*, 272(2):38, 1995.

WATSON, J. D. *et al. Molecular Biology of the Gene*, 4th ed. Benjamin-Cummings, 1987.

WOLFFE, A. O. P. Genetic effects of DNA packaging. *Sci. and Med.*, 2(6):68, 1995.

WOODCOCK, C. L. and HOROWITZ, R. A. Chromatin organization reviewed. *Trends. Cell Biol., 5*:272, 1995.



Ação Gênica

Roteiro

- *O RNA geralmente é transcrito em moléculas maiores, que passam por um processo de acabamento antes de migrarem para o citoplasma.*
- *Os mRNAs apresentam trios de nucleotídeos, ou códons, para os diversos aminoácidos.*
- *Os trios nucleotídicos dos tRNAs, complementares dos códons, são chamados anticódons.*
- *Com exceção da metionina e do triptófano, todos os demais aminoácidos possuem mais de um códon.*
- *Existem 61 códons e apenas 40 anticódons, portanto, um mesmo tRNA pode reconhecer mais de um códon, porém sempre para o mesmo aminoácido.*
- *As aminoacil-tRNA sintetases têm especificidade dupla: para o aminoácido e para seu tRNA.*
- *A síntese protéica tem lugar nos polirribosomas.*
- *Nas células procariontes, o controle gênico pode ser explicado pelo modelo do óperon.*
- *Os óperons regulam os genes relacionados com as necessidades nutritivas das bactérias.*
- *Nas células eucariontes, o controle gênico tem funções muito mais amplas: formação de tecidos e órgãos, crescimento etc.*
- *As mutações são alterações na seqüência nucleotídica do DNA.*
- *O câncer pode resultar de mutações em células somáticas, gerando clones celulares que proliferam desordenadamente.*
- *Proto-oncogenes podem modificar-se em c-oncogenes.*
- *Os oncogenes transmitidos pelos vírus são chamados v-oncogenes.*
- *O controle gênico se exerce principalmente na transcrição.*
- *Pode ocorrer também controle gênico na tradução.*
- *Os cromosomas gigantes (politênicos e plumosos) permitem o estudo da transcrição com o microscópio óptico.*
- *As endonucleases de restrição permitem cortar o DNA em locais específicos.*
- *Como existem muitas endonucleases de restrição, é possível usá-las como se fossem bisturis, para obtenção dos fragmentos de DNA desejados.*
- *Os fragmentos de DNA assim obtidos podem ser multiplicados à vontade, por clonagem.*
- *A fabricação em laboratório de proteínas específicas pode ser feita pelos hibridomas.*

Uma das funções do DNA dos cromosomas é servir de molde para sua própria duplicação na fase S do ciclo celular, sendo as cópias distribuídas para as células-filhas. Outra função do DNA é a passagem da informação nele contida para as moléculas dos três tipos de RNA: RNA de transferência, RNA mensageiro e RNA ribosômico (Figs. 9.1 e 9.2) que migram para o citoplasma, onde vão dirigir a síntese das moléculas protéicas, através das quais os genes vão expressar-se no fenótipo. É vantajosa a utilização pela célula dos diversos tipos de RNA como intermediários na síntese de proteínas. Assim é mais fácil preservar inalterado o programa original contido no DNA. Além disso, seria muito complicado manter junto ao DNA a complexa maquinaria da síntese protéica das celulas eucariontes. É mais prático para essas células ter um compartimento, o núcleo, onde o DNA é mantido, replicado e transcrito em RNA de transferência (tRNA), RNA mensageiro (mRNA) e RNA ribosômico (rRNA). Em outro compartimento, o citoplasma, têm lugar a síntese, o acabamento e a distribuição das moléculas protéicas.

Nas células eucariontes, o RNA é transcrito como moléculas maiores que são reduzidas de tamanho por um processo intranuclear de acabamento. Nesse processo está incluído o *splicing*, que consiste na remoção e digestão de segmentos chamados **íntrons** e junção dos segmentos funcionais, os **éxons**, que vão constituir a molécula final de mRNA (Figs. 9.3 e 9.4). O *splicing*, processo de acabamento do RNA, é muito complexo e preciso, porque a molécula de RNA inicialmente transcrita deve ser cortada em locais exatos, e as partes funcionais ou éxons devem ser emendadas também de maneira exata. O processo envolve enzimas para a ruptura das moléculas de RNA e ligação das partes que comporão o RNA final. A precisão do processo pode ser apreciada, por exemplo, pela observação de que defeito na posição de uma ou duas bases na molécula acabada de um RNA mensageiro (mRNA) pode originar uma proteína completamente diferente, isto é, com seqüência de aminoácidos diversa da seqüência normal.

Portanto, para exercerem suas atividades, os genes, que são segmentos de DNA dos cromosomas com seqüência definida de nucleotídeos para codificar uma molécula específica de RNA, necessitam primeiramente ser transcritos. A transcrição é feita por RNA-polimerases dependentes de DNA (Fig. 9.5), que apresentam certas características comuns a todas elas. 1) Só realizam a polimerização de ribonucleotídeos, para formar RNA, na presença de um modelo ou *template* de DNA, que pode ser um filamento simples de DNA ou uma dupla hélice. 2) São necessários os quatro trifosfatos de ribonucleosídeos precursores do RNA, ou seja, ATP, CTP, GTP e UTP. 3) As RNA-polimerases requerem os cátions Mn^{2+} ou Mg^{2+} para exercerem atividade enzimática. 4) A transcrição tem lugar apenas num filamento de DNA de determinado local da dupla hélice, tratando-se assim de uma transcrição assimétrica (a replicação do DNA pela DNA-polimerase também é assimétrica). 5) As RNA-polimerases não dependem de um iniciador ou *primer*, ao contrário do que acontece com as DNA-polimerases.

Código genético

O problema central que se apresenta na expressão gênica através da síntese protéica é a transferência sem erro da informação contida no DNA para uma seqüência de aminoácidos. Como os ácidos nucléicos são formados por nucleotídeos e as proteínas por aminoácidos, o processo se resume basicamente na conversão de uma seqüência de nucleotídeos em uma seqüência de aminoácidos. O código para esta conversão está contido no mRNA, sendo complementado pelo tRNA. Convencionou-se chamar de **códon** ao trio de nucleotídeos do RNA mensageiro que é complementar e, portanto, reconhecido pela seqüência de três nucleotídeos do RNA de transferência, chamada **anticódon**. Esses dois RNAs se prendem por ligações químicas fracas (pon-

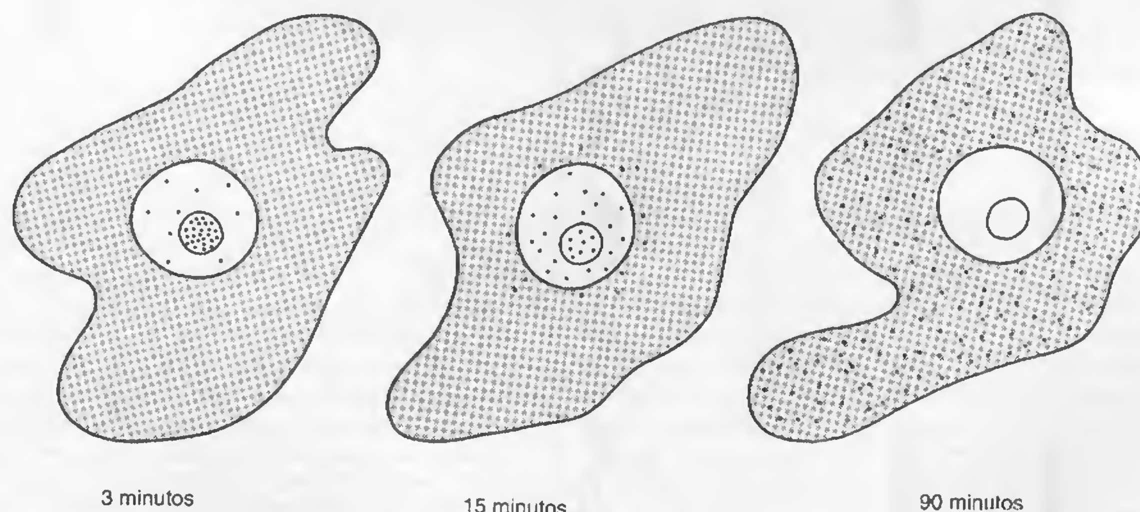


Fig. 9.1 Incorporação de um precursor de RNA em célula de cultura de tecido. Adicionou-se citidina H^3 à cultura, células foram transferidas para um meio sem isótopo e fixadas após 3, 15 e 90 minutos de permanência na cultura não-radioativa. Em seguida, essas células foram radioautografadas. Observa-se que, nos primeiros minutos, a incorporação se dá apenas no núcleo, concentrando-se no nucléolo e espalhando-se daí para o citoplasma. Após 90 minutos, os grãos de prata, que indicam radioatividade, desaparecem do núcleo e se apresentam apenas no citoplasma. Esses resultados mostram que a síntese de RNA é exclusivamente nuclear e que o RNA aí produzido migra para o citoplasma.

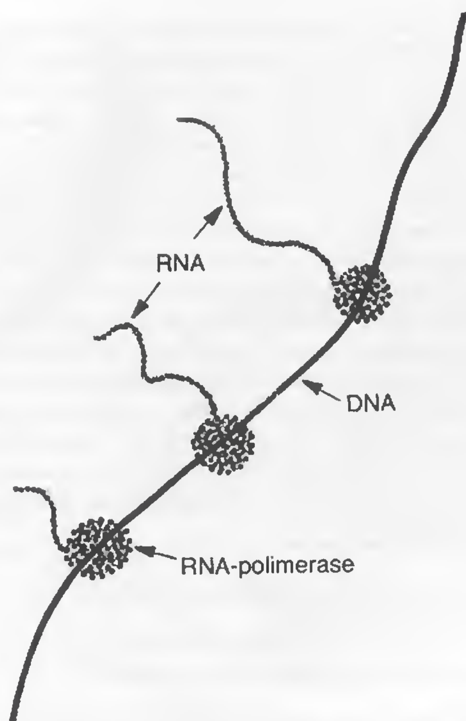


Fig. 9.2 Esquema mostrando a síntese de RNA a partir de molde de DNA. Feito com base em imagens que se observam no microscópio eletrônico. À medida que a polimerase caminha pelo filamento de DNA, vai transcrevendo para o RNA a informação do DNA.

tes de hidrogênio) que se formam entre as bases do trio nucleotídico do códon e as do trio complementar do anticódon.

O RNA possui apenas quatro bases diferentes (adenina, citosina, guanina e uracila), porém existem cerca de 20 aminoácidos formando as proteínas. Isto levou à suposição, experimentalmente comprovada, de que o código genético é escrito com três bases para cada aminoácido.

A Tabela 9.1 mostra os códons para os 20 aminoácidos, verificando-se que 61 codificam aminoácidos e três servem para determinar que a molécula protéica deve ser terminada. São os **códons de terminação** UAA, UAG e UGA. O códon AUG, conhecido como **códon de iniciação**, é parte do sinal para início da cadeia polipeptídica. Isso quando ele está localizado na extremidade do mRNA; quando está situado em outra posição na molécula do mRNA, codifica o aminoácido metionina.

O exame da Tabela 9.2 mostra que, com exceção dos códons para metionina e triptófano, todos os outros aminoácidos têm mais de um códon. Por outro lado, o código genético é **universal**, sendo o mesmo para todos os organismos procariontes e eucariontes. Uma exceção são as mitocôndrias, que apresentam diversos códons exclusivos, embora não se possa explicar o motivo desta exceção. A observação de que existem vários códons para o mesmo aminoácido faz supor, o que foi confirmado, que existem também vários tRNAs com os anticódons correspondentes. Foi observado experimentalmente que não são necessários 61 tRNAs diferentes, um para cada anticódon. Um mesmo anticódon reconhece mais de um códon. Este resultado inesperado foi explicado pela hipótese de que a base na posição

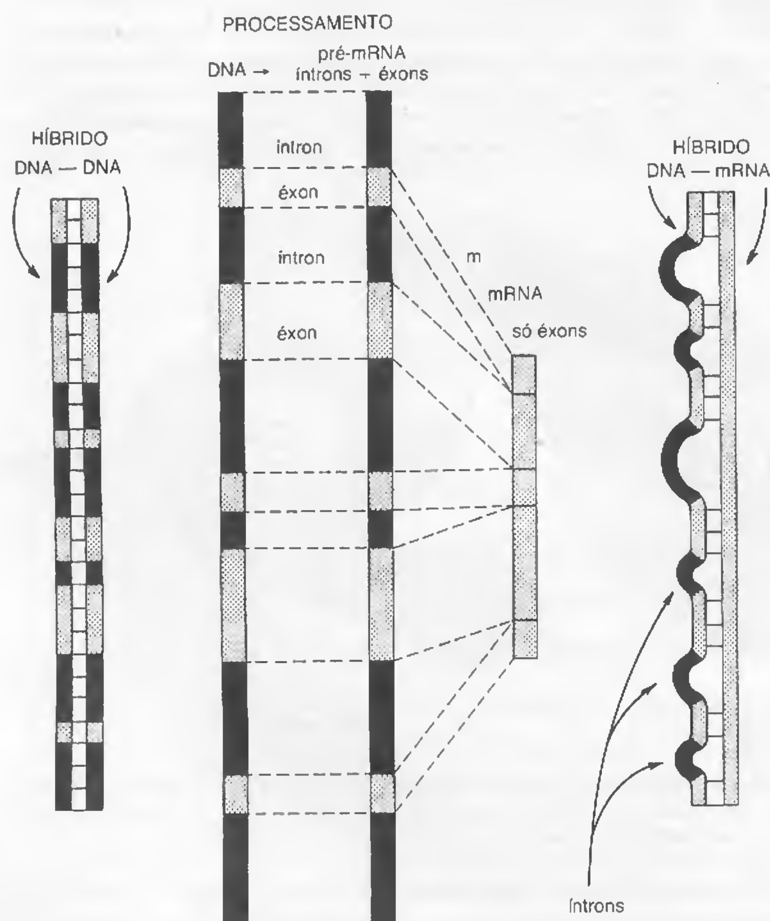


Fig. 9.3 Desenho esquemático ilustrando o processamento do mRNA na célula eucarionte e a hibridização de DNA com mRNA ou com DNA. No **centro** da figura, a seqüência de eventos na síntese do mRNA que se inicia pela transcrição dos éxons e íntrons do DNA produzindo o pré-mRNA. Em etapa posterior, o transcrito é fragmentado e os segmentos correspondentes aos éxons se acoplam produzindo uma molécula menor, devido à eliminação dos íntrons. À **esquerda**, o resultado da hibridização do DNA com DNA, onde ocorre hibridização em toda a extensão do fragmento, devido à sua homologia total. O mesmo não ocorre à **direita**, devido à homologia incompleta entre o DNA e o mRNA.

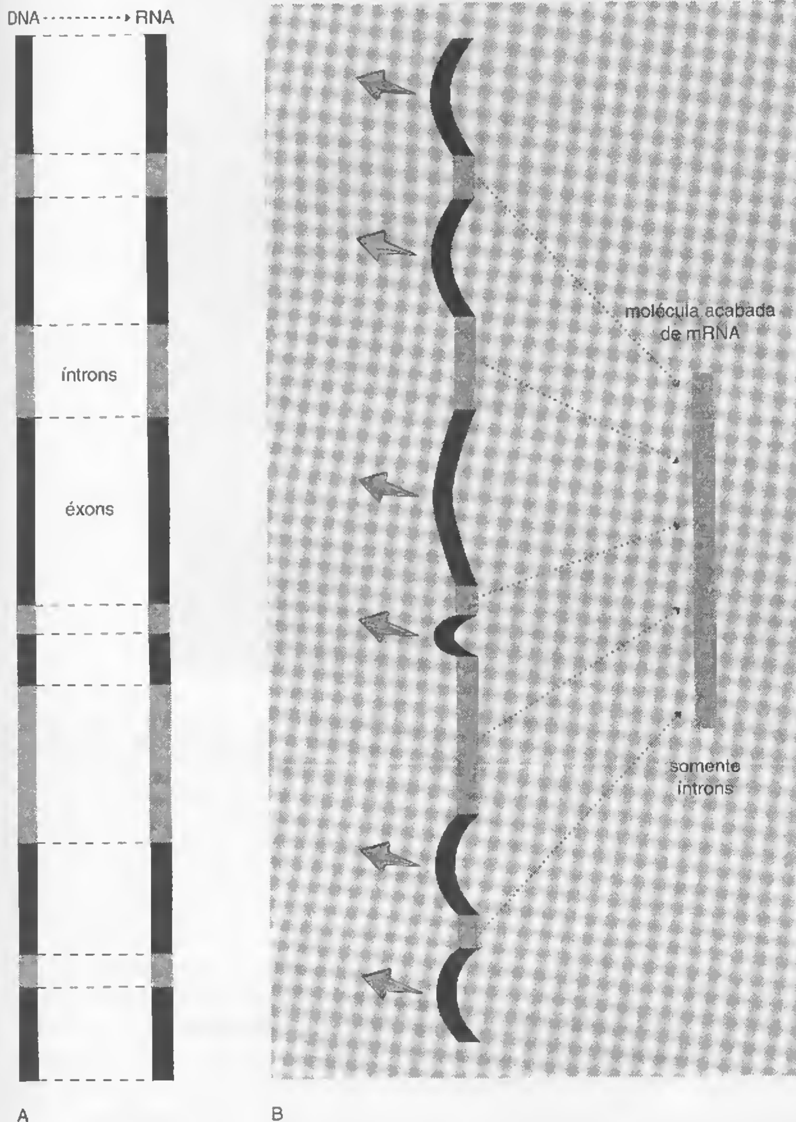


Fig. 9.4 Desenho esquemático mostrando o processo normal de *splicing* que ocorre em todas as células. O RNA precursor é sintetizado sobre um molde de DNA, contendo segmentos codificadores ou íntrons e segmentos não-codificadores ou éxons. Os éxons são removidos da molécula de RNA, inicialmente formada, por um processo complexo que tem lugar no núcleo celular. Em seguida, o RNA mensageiro acabado, constituído exclusivamente por íntrons, migra para o citoplasma, onde vai dirigir a síntese da respectiva proteína.

5' do anticódon oscila no espaço (*wobble hypothesis*), o que permite formar pontes de hidrogênio com algumas bases diferentes na posição 3' do códon.

A síntese protéica é um dos processos bioquímicos mais complexos que ocorrem nas células e, como é fácil perceber, de extrema importância biológica. Calcula-se que são necessárias cerca de 200 proteínas diferentes para que a célula possa produzir moléculas protéicas. Dentro do escopo deste livro, será apresentado a seguir um pequeno resumo da síntese protéica. A primeira etapa é a ativação dos aminoácidos por ATP, com a formação de aminoacil-adenilatos, seguida pela combinação do grupo carboxila do aminoácido com o respectivo tRNA. Tanto a formação dos aminoacil-adenilatos como a ligação destes com os tRNAs são catalisadas pela mesma enzima, chamada **aminoacil-tRNA sintetase**. Cada aminoácido é ativado por uma sintetase que tem especificidade dupla: para o aminoácido e para os respectivos tRNAs. A ligação do aminoácido ao seu tRNA é a única fase no processo de síntese protéica na qual a identidade do aminoácido toma parte.

Depois da aminoacilação do tRNA, os eventos da síntese protéica passam a ter lugar nos ribosomas. Os ribosomas oferecem locais onde os outros componentes da síntese protéica (mRNA, aminoacil-tRNA, a cadeia polipeptídica em formação, fatores protéicos solúveis, moléculas de GTP) se colocam em posição que torna possível ao código genético contido no mRNA ser traduzido corretamente, formando-se uma cadeia polipeptídica. Cada ribosoma recebe duas moléculas de tRNA simultaneamente. Os eventos que ocorrem nos ribosomas envolvem proteínas do citosol que participam das diferentes etapas da síntese protéica.

A síntese protéica se continua com a ligação do aminoacil-adenilato mais o tRNA iniciador à subunidade menor do ribosoma. Nas bactérias, mais bem estudadas do que as células eucariontes, o iniciador é sempre a N-formilmetionil tRNA (fMet

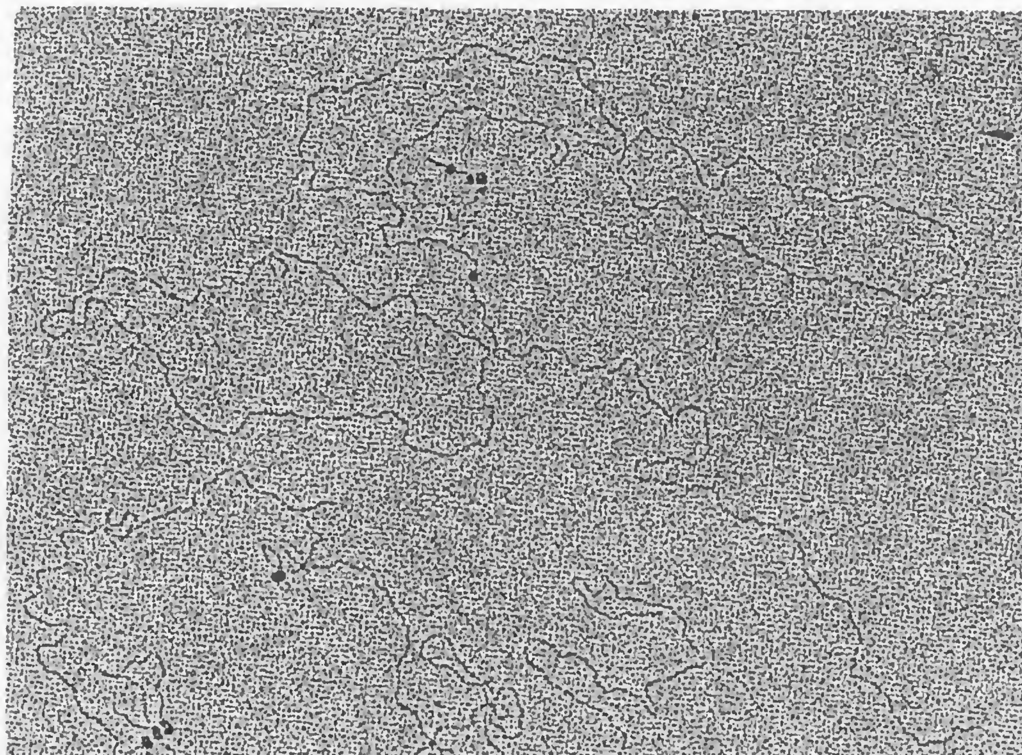


Fig. 9.5 Micrografia eletrônica do complexo formado pela RNA-polimerase com o DNA durante a síntese de RNA. O DNA aparece como um filamento em que se fixam as unidades de polimerase, que aparecem como grânulos densos. Aumento: 40.000 ×. (*Cortesia de R. Portmann, J. M. Sogo, K. Kollerg e W. Sillig. F. E. B. S. Letteres*, 45:64, 1964.)

Tabela 9.1 O código genético. Exemplos da utilização desta tabela: ACU é um códon para treonina; UGA é um códon de terminação da molécula protéica

1ª posição extremidade 5' ↓	2ª posição U	C	A	G	3ª posição extremidade 3' ↓
U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr Terminação Terminação	Cys Cys Terminação Trp	U C A G
C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G
A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G
G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G

Tabela 9.2 Mostrando os símbolos internacionais para os aminoácidos e os respectivos códons. Note que, na maioria das vezes, os códons para um mesmo aminoácido variam apenas na última base (posição 3')

AMINOÁCIDOS Símbolos	Nomes	Códons					
Ala	Alanina	GCA	GCC	GCG	GCU		
Cys	Cisteína	UGC	UGU				
Asp	Ácido aspártico	GAC	GAU				
Glu	Ácido glutâmico	GAA	GAG				
Phe	Fenilalanina	UUC	UUU				
Gly	Glicina	GGA	GGC	GGG	GGU		
His	Histidina	CAC	CAU				
Ile	Isoleucina	AUA	AUC	AUU			
Lys	Lisina	AAA	AAG				
Leu	Leucina	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
Met	Metionina	AUG					
Asn	Asparagina	AAC	AAU				
Pro	Prolina	CCA	CCC	CCG	CCU		
Gln	Glutamina	CAA	CAG				
Arg	Arginina	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
Ser	Serina	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
Thr	Treonina	ACA	ACC	ACG	ACU		
Val	Valina	GUA	GUC	GUG	GUU		
Trp	Triptofano	UGG					
Tyr	Tirosina	UAC	UAU				

tRNA). Em seguida, o RNA mensageiro junta-se ao complexo formado pela subunidade ribossômica menor + fMet tRNA + GTP, de modo que o códon de iniciação, AUG, interage com o anticódon da fMet tRNA, formando-se assim o **complexo de iniciação**. Em seguida, a subunidade maior (50S) do ribosoma junta-se a esse complexo, formando o ribosoma completo com 70S (célula procarionte). É interessante notar que a fMet liga-se à subunidade ribossômica menor sem interferência do mRNA, que só é adicionado posteriormente. Nas células eucariontes, o iniciador é a metionina não-formilada ligada ao seu tRNA.

Como os ribosomas têm dois locais para entrada dos aminoacil-tRNAs, ocorre uma ligação peptídica entre os dois aminoácidos próximos e, imediatamente, o deslocamento de um deles para fora do ribosoma. Assim, fica um local vago no ribosoma para entrada de novo aminoacil-tRNA, conforme o códon do mRNA. Sempre que sai um aminoácido, já inserido na nova cadeia polipeptídica, há transferência do que ficou no ribosoma para o sítio de saída (sítio P), ficando vazio o sítio de entrada (sítio A).

O alongamento da cadeia polipeptídica se continua até o ribosoma encontrar, no mRNA, um código ou trio de terminação, o que determina a liberação do último aminoácido e a separação das duas subunidades ribossômicas, que podem ser usadas novamente para produzir outras novas cadeias polipeptídicas.

Os **polirribosomas** se formam porque vários ribosomas traduzem simultaneamente a mesma molécula de mRNA, cada ribosoma dando origem a uma cadeia polipeptídica igual à originada nos outros ribosomas ligados ao mesmo mRNA. Pode ocorrer uma amplificação da informação gênica durante a tradução, dependendo principalmente da duração da molécula de mRNA. Uma molécula de RNA mensageiro que dura apenas alguns minutos traduz menor número de moléculas protéicas do que uma de RNA mensageiro que persiste no citoplasma 3 horas antes de ser degradado. É bem conhecida a amplificação traducional que ocorre nas células do bicho-da-seda, *Bombyx mori*. Enquanto a vida média dos mRNAs em geral é 2-3 horas, o mRNA da fibroína, proteína que constitui a seda, é estável e dura alguns dias, calculando-se que cada molécula do mRNA da fibroína é traduzida 10^5 vezes.

Chama-se **transcrição** o processo de síntese de RNA baseado num molde de DNA. Por esse motivo, a **RNA-polimerase** também é chamada **transcriptase**. Existe uma enzima que realiza o processo inverso, isto é, a produção de DNA a partir de um modelo de RNA: é a **transcriptase reversa**.

Todas as provas que existem sobre a informação genética dos núcleos de todos os tecidos apóiam a idéia de que, com exceção do DNA mitocondrial e dos cloroplastos, os núcleos em geral contêm o patrimônio genético completo da espécie. Por outro lado, considera-se estabelecido que todos os genes não se expressam simultaneamente em todas as células; a maioria fica inativa e só alguns estariam transcrevendo-se. Os genes ativos variam de um tipo de célula a outro, e é lógico supor que grande parte dos genes ativos em fibroblastos deve ser diferente dos genes ativos em uma célula nervosa ou pancreática. O problema-chave que surge é, pois, analisar qual o mecanismo ou mecanismos utilizados pela célula para ativar ou inibir genes específicos de seu genoma. Esse processo apresenta seu maior florescimento durante o desenvolvimento embrionário, época em que as células em fase de diferenciação vão adquirindo funções específicas (Cap. 11).

O modelo do óperon

Como resultado de uma série de experiências sobre os mecanismos genéticos em *Escherichia coli* (bacilo presente no intestino humano), em 1961 Jacob e Monod propuseram um modelo, denominado **óperon**, que explica um determinado tipo de con-

trole sobre a atividade dos genes nos organismos procariontes. Através do estudo de mutantes de *E. coli*, esses autores observaram a existência de três genes relacionados com a síntese de três proteínas responsáveis pela utilização de lactose pela célula. São a β-galactosidase, a lacpermease (lactose permease) e a transacetilase, enzimas necessárias para a utilização da lactose pela bactéria.

Quando as bactérias são cultivadas num meio nutritivo sem lactose, os genes correspondentes às três enzimas já mencionadas não são transcritos, e as enzimas não são sintetizadas pelas bactérias. Mas, quando se adiciona lactose ou outro substrato da enzima β-galactosidase, as proteínas codificadas pelos três genes são sintetizadas. Assim sendo, a lactose **induz a ativação** destes genes.

O **óperon** é um conjunto de genes, situados próximos uns aos outros no cromosoma bacteriano, que contêm a informação para a síntese das enzimas de uma via metabólica. A ativação do óperon leva à formação de todas as enzimas necessárias para a atividade da via metabólica controlada pelo óperon. Inversamente, a desativação do óperon paralisa a produção de todas as enzimas da mesma via metabólica. O segmento cromosômico que constitui o óperon é formado de um **gene regulador,** uma região **promotora,** uma região **operadora** e dos **genes estruturais.** Os genes estruturais são assim chamados porque determinam a estrutura das proteínas que representam a atividade gênica do óperon. No exemplo mencionado, essas proteínas são: a β-galactosidase, a lactose permease e a transacetilase.

A Fig. 9.6 representa esquematicamente o mecanismo de funcionamento do óperon. O gene regulador ou indutor (i) produz uma proteína chamada **repressor,** que se combina com o DNA que constitui o segmento operador (o). Isto impede a combinação do DNA do segmento operador com a RNA-polimerase e a transcrição dos genes estruturais. Portanto, o segmento de DNA do operador é aquele que determina a atividade dos genes estruturais, mas está sob o controle do DNA do segmento repressor. Quando a lactose penetra na célula, combina-se com a proteína codificada pelo repressor. Esta combinação modifica a estrutura da proteína repressora de tal modo que reduz sua afinidade pelo DNA do operador. Como conseqüência, a RNA-polimerase se combina com o operador e põe em atividade a transcrição dos genes estruturais (z, y, a), que passam a sintetizar os RNAs mensageiros, que codificam as enzimas da via metabólica (β-galactosidase, lacpermease e transacetilase).

Expressão gênica

Nas células procariontes, a regulação da expressão gênica é realizada pelo promotor, que é uma seqüência de nucleotídeos situada na frente, ou seja, "rio acima", perto da seqüência que codifica a proteína a ser sintetizada. Para ocorrer a transcrição de DNA para RNA, a RNA-polimerase deve se associar ao promotor, para depois escorregar "rio abaixo", pela região codificadora, como uma locomotiva caminha sobre os trilhos. Nas células procariontes, a RNA-polimerase é direcionada para os promotores dos genes específicos a serem ativados, por proteínas denominadas **fatores sigma**, que ligam as moléculas de RNA-polimerase aos promotores certos. Os fatores sigmas são essenciais, porque a RNA-polimerase não distingue um promotor do outro e, assim, não saberia como transcrever os genes de acordo com as necessidades da célula. A descoberta dos fatores sigma é posterior aos estudos de Jacob e Monod, por isso eles não aparecem no modelo do óperon, conforme proposto por estes dois pesquisadores e já descrito neste capítulo.

Nas células eucariontes, o processo é mais complexo. Nessas células, existem três tipos de seqüências nucleotídicas controladoras diferentes, que regulam a atividade da RNA-polimerase. Uma dessas seqüências, o **promotor**, está situada "rio acima" e ao lado da seqüência codificadora, como nas células procariontes. Os outros dois tipos de seqüências nucleotídicas controladoras, para surpresa geral, se situam longe, a milhares de nucleotídeos da seqüência codificadora, podendo se locali-

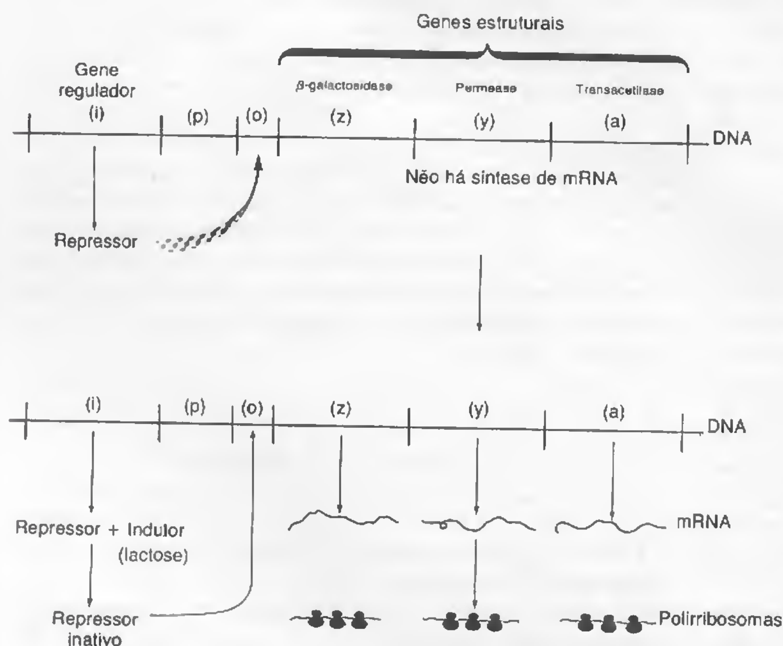


Fig. 9.6 Esquemas do óperon da via metabólica que utiliza a lactose (lac-óperon). Na **falta de lactose** no meio de cultura da bactéria (**desenho de cima**), a proteína (repressor) codificada pelo gene regulador ou indutor (i) e que tem grande afinidade pelo DNA se combina com o segmento operador (o), bloqueando a entrada da RNA-polimerase e a transcrição do óperon. Na **presença de lactose** (indutor), este hidrato de carbono se combina com a proteína repressora (repressor), modificando a forma de sua molécula de modo que ela perde a afinidade para o DNA e não se combina com o cromosoma, possibilitando a entrada da RNA-polimerase que transcreve os três genes estruturais (z, y, a), formando os RNAs mensageiros para as enzimas da via metabólica controlada pelo óperon. Neste exemplo, a lactose oferecida à célula procarionte pelo meio de cultura induziu a síntese das enzimas necessárias para a utilização desse glicídeo. O segmento promotor está indicado no desenho pela letra (p).

zar "rio acima" ou "rio abaixo" (Fig. 9.7). Apareceu, assim, o problema de explicar como é que de tão longe podem estas seqüências afetar o funcionamento do gene. Os dois tipos de seqüências controladoras distantes foram denominados de **silenciador** e **reforçador** (*silencer* e *enhancer*), porque agem ativando ou deprimindo a transcrição. A transmissão, para o promotor, das informações geradas nos silenciadores e reforçadores é feita através de um **complexo protéico regulador**, constituído por diversas proteínas diferentes, que executam nas células eucariontes o papel dos fatores sigma nas procariontes. Esses complexos protéicos reguladores fariam o papel de pontes, ligando trechos distantes da cadeia do DNA, como se vê na Fig. 9.7. A maior quantidade de seqüências reguladoras (silenciadoras e reforçadoras) associadas à grande quantidade de proteínas do complexo protéico regulador pode explicar a grande diversidade dos mecanismos reguladores, necessários para orquestrar a atividade dos 100.000 a 150.000 genes que constituem o genoma humano. Percebe-se, pela presente descrição, que conhecer a intimidade dos mecanismos de controle gênico nas células da espécie humana depende de muito mais do que apenas saber qual a seqüência nucleotídica dos genes.

Nas bactérias (celulas procariontes), o controle da atividade gênica está relacionado exclusivamente com as necessidades de nutrição, crescimento e proliferação. A regulação dos genes tem por finalidade principal ajustar a célula às modificações nutricionais do meio ambiente, de modo a maximizar o crescimento e a proliferação das bactérias. No exemplo já mencionado do óperon da lactose na bactéria *Escherichia coli*, o hidrato de carbono normalmente metabolizado pela bactéria é a glicose. Na presença de glicose em abundância, a célula não produz as proteínas transportadoras e enzimáticas necessárias para utilização de outros açúcares. Quando não há glicose mas sim lactose no meio de cultura, a célula desativa os genes programados para codificar as moléculas destinadas à metabolização de glicose e

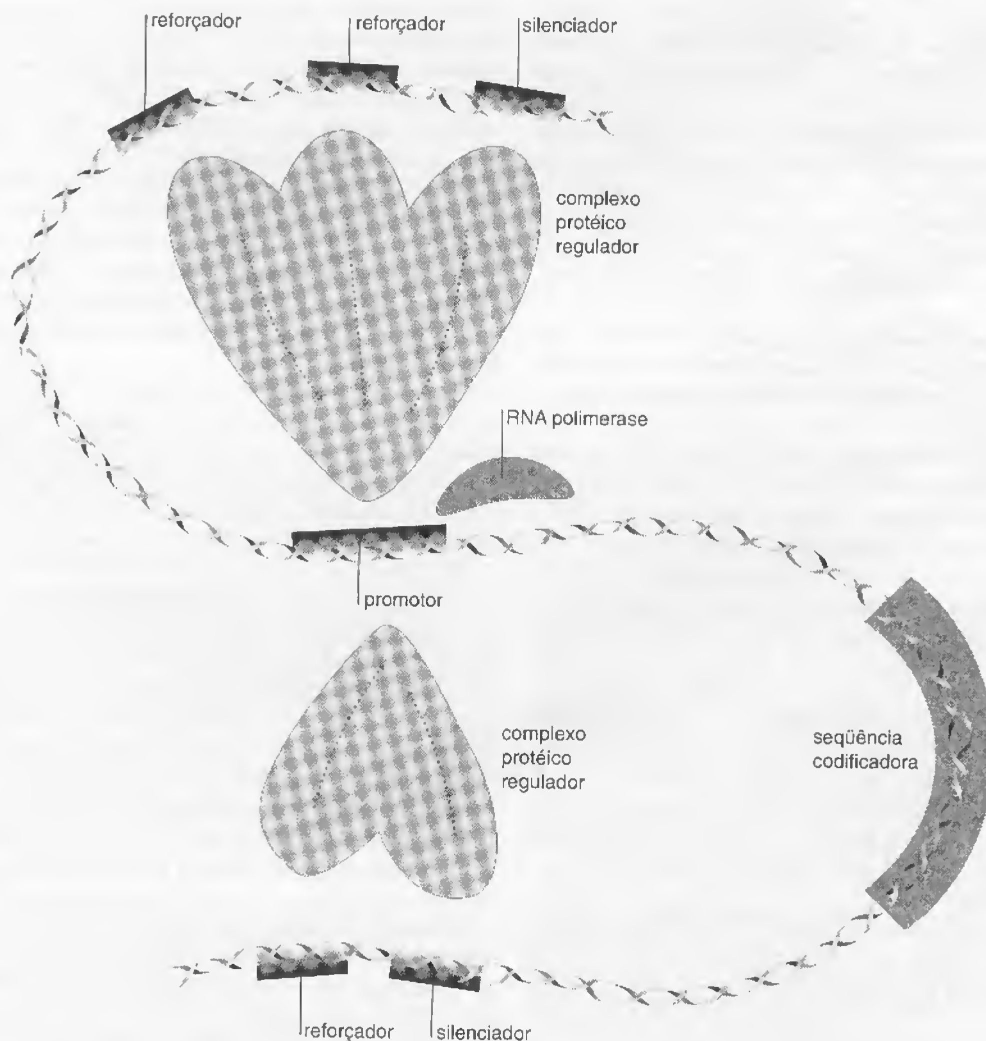


Fig. 9.7 Esquema de controle gênico em célula eucarionte. Proteínas repressoras se prendem a locais específicos do DNA, denominados silenciadores. Isto interfere com o funcionamento dos ativadores e, assim, reduz a transcrição. As proteínas ativadoras se ligam aos segmentos de DNA denominados reforçadores. As proteínas ativadoras colaboram na ativação dos genes e aceleram a transcrição. Através dos complexos protéicos reguladores, os segmentos reforçadores e silenciadores influem sobre o segmento de DNA chamado promotor.

ativa os genes para as moléculas necessárias à utilização de lactose. Embora se trate de um controle gênico bastante refinado, ele visa tão-somente à economia da maquinaria metabólica. Seria um desperdício para a bactéria fabricar enzimas e transportadores destinados a metabolizar hidratos de carbono que não existem no meio ambiente, não sendo portanto disponíveis para consumo pela célula.

Nos metazoários, o controle gênico tem outras finalidades. Embora certos genes de células eucariontes respondam diretamente a modificações químicas do meio ambiente, geralmente nos metazoários o controle gênico não tem relação com as necessidades nutritivas das células, mas sim com a formação de um organismo multicelular complexo constituído por diversos tipos de células, tecidos e órgãos. Portanto, na maioria das células eucariontes o problema principal do controle gênico é a diferenciação celular (v. Cap. 11). Como todas as células de um determinado organismo têm os mesmos genes, as diferenças morfológicas e funcionais entre elas devem-se à ativação de certos genes e à inativação de outros, de modo ordenado, numa seqüência temporal preestabelecida pelos próprios genes. Nessas ativações e inativações gênicas, tomam parte numerosos sinais químicos (moléculas sinalizadoras) transmitidos entre as células e entre a matriz extracelular e as células. Esses sinais químicos regulam o programa inscrito no DNA para a formação do organismo.

Chama-se **mutação** a qualquer modificação na seqüência de nucleotídeos na molécula do DNA celular. Geralmente, a mutação se revela na seqüência nucleotídica do RNA mensageiro e na molécula protéica codificada por ele. As mutações podem envolver segmentos de DNA de diversos tamanhos e, até mesmo, se restringirem à substituição de uma única base na molécula de DNA.

A alteração de apenas uma base chama-se *point mutation* ou **mutação punctiforme**, e pode até passar despercebida no fenótipo, mas pode também ter efeitos altamente prejudiciais para o organismo.

Um exemplo bem conhecido de mutação punctiforme com efeitos dramáticos é a mutação do códon GAA (para ácido glutâmico) para o códon GUA (para valina) na molécula do mRNA da hemoglobina humana. A hemoglobina anormal que se forma contém apenas um aminoácido errado: valina no lugar de ácido glutâmico na posição 6 da cadeia β da hemoglobina. Mas, do ponto de vista funcional, esta hemoglobina patológica é muito diferente da hemoglobina normal, e os portadores desta mutação sofrem de uma doença hereditária grave nos indivíduos homozigóticos, chamada **anemia falciforme**. Nos vasos sangüíneos onde a pressão de oxigênio é baixa, a "hemoglobina falciforme" torna-se um gel semi-sólido, causando uma deformação nas hemácias, que então assumem a forma de foice, tornam-se inflexíveis e obstruem as pequenas artérias e capilares. Como essas hemácias deformadas são frágeis, elas se rompem com muita facilidade, causando anemia.

Quando a mutação punctiforme não leva à modificação de um único códon, mas se traduz por leitura errada do mRNA e produção de uma proteína diferente, diz-se que se trata de uma **mutação de enquadramento** ou *frameshift mutation*. Um exemplo, embora hipotético, esclarecerá melhor. Supondo a seqüência seguinte de códons, formar-se-á, na proteína, a seqüência de aminoácidos indicada:

UAU	CCA	UAC	CCA	UAU...
Tyr	Pro	Tyr	Pro	Tyr...

A **introdução** de apenas uma base a mais, G por exemplo, levará a uma leitura diferente porque os trios que constituem os códons ficam modificados:

base adicionada na mutação ↙

UAU	GCC	AUA	CCC	AUA	U...
Tyr	Ala	Ile	Ser	Ile...	

Existem vários outros tipos de mutação, como, por exemplo, a introdução do códon de terminação GAC no meio da molécula de um mRNA. Neste caso, a cadeia polipeptídica é interrompida quando o processo de tradução encontrar o códon GAC no meio da molécula do mRNA. Assim, a proteína formada terá uma molécula muito menor do que a molécula normal que seria sintetizada sem a mutação.

Quando a mutação acontece numa célula da linhagem germinativa (óvulo, espermatozóide), ela se transmite às gerações subseqüentes.

No entanto, as mutações nas células somáticas podem formar clones de células modificadas que proliferam no próprio indivíduo onde a mutação ocorrer (Fig. 9.8). As células cancerosas são mutantes desta natureza. O problema da gênese do câncer é muito complexo, e o aparecimento de células cancerosas depende de múltiplos fatores, mas o resultado é sempre um clone mutante, que constitui o próprio câncer. Em essência, o clone de células cancerosas resulta de defeitos (mutações múltiplas) no programa genético inscrito na célula. Trata-se, portanto, de uma doença do DNA cromossômico e de natureza monoclonal. Todas as células de um tumor maligno (câncer) e suas **metástases** derivam de uma única célula transformada pela atividade dos **oncogenes**. Os oncogenes são segmentos de DNA responsáveis pela transformação cancerosa.

Os primeiros oncogenes descobertos foram os derivados dos vírus com genoma de RNA, denominados **retrovírus**, porque seu genoma precisa ser transcrito em DNA para poder inserir-se nos cromosomas. Portanto, nesse caso a informação genética flui para trás, pois, enquanto usualmente a direção informacional passa do DNA para o RNA, no retrovírus ela passa do RNA para o DNA (*retro*, para trás). A cópia de DNA em modelo de RNA é catalisada pela enzima denominada **transcriptase reversa**. O primeiro retrovírus cancerígeno descoberto foi o RSV ou vírus do sarcoma de Rous, que causa um tipo de câncer em galinhas. Embora esta descoberta tenha sido feita em 1911, somente na década de 70 é que se começou a conhecer melhor o papel do vírus na gênese do câncer. Os oncogenes introduzidos no DNA celular pelos vírus de RNA ou de DNA são chamados v-oncogenes (v-onc). É interessante notar que até agora têm sido descobertos oncogenes celulares equivalentes a todos os v-oncogenes, o que reforça a suposição de que o genoma viral se originou do genoma das células.

Os genes celulares que podem ser ativados e originam câncer são chamados **proto-oncogenes**, enquanto funcionam normalmente, obedecendo aos mecanismos de controle do organismo. Quando um proto-oncogene escapa dos controles normais da célula e origina um câncer, passa a ser conhecido como c-oncogene (c-onc). Os proto-oncogenes têm um papel funcional em certa época do desenvolvimento, principalmente no período embrionário. Além dos proto-oncogenes homólogos dos v-oncogenes, há outros que não têm qualquer semelhança com genomas virais.

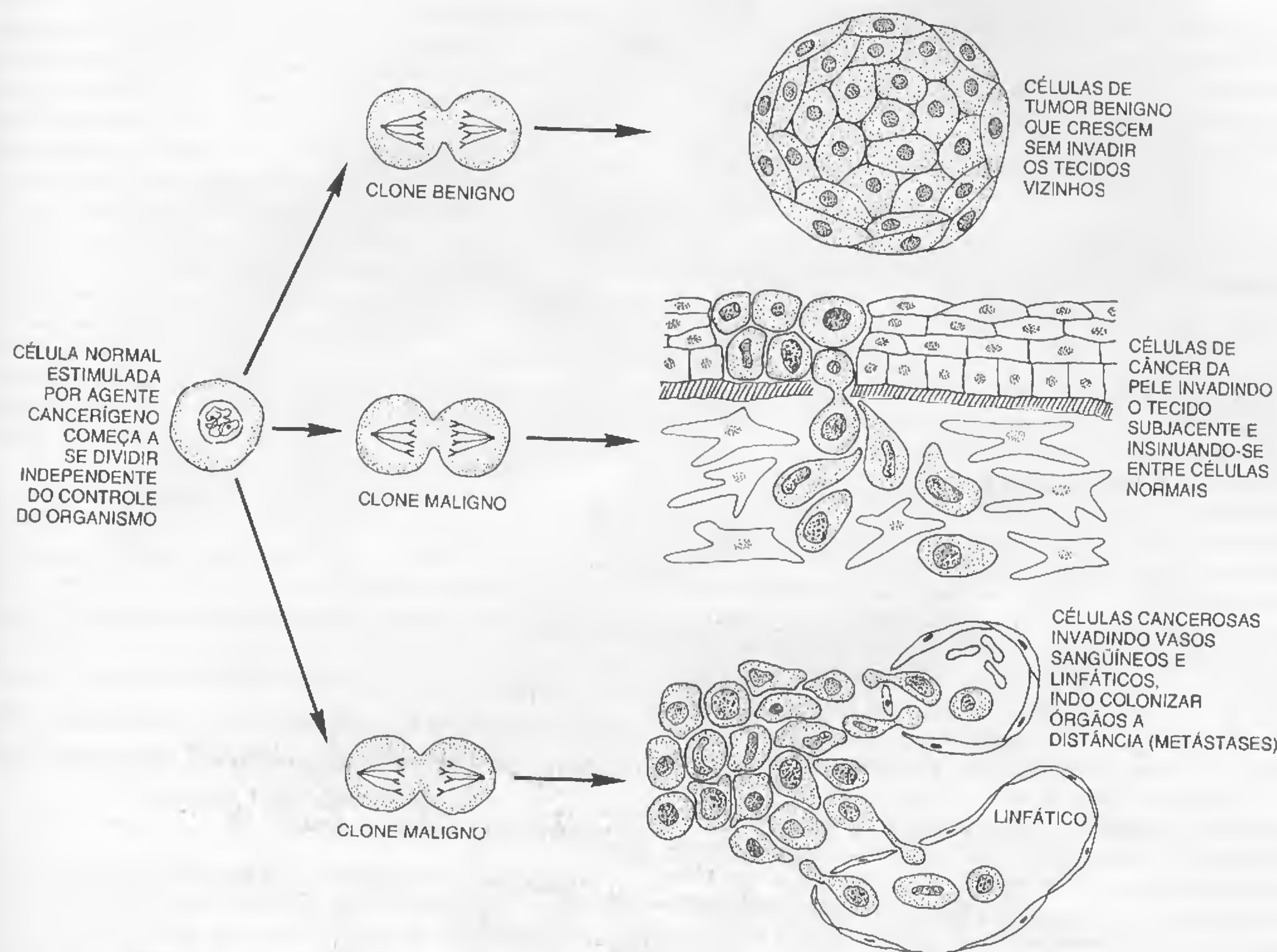


Fig. 9.8 Desenhos esquemáticos ilustrando algumas diferenças entre um tumor benigno (**desenho do alto**) e dois tumores malignos (**desenhos de baixo**). Observe que o tamanho das células e dos núcleos é mais regular no tumor benigno. A variabilidade nuclear, a capacidade de invadir os tecidos vizinhos e de se propagar pelos vasos sangüíneos e linfáticos, gerando **metástases**, são características dos tumores malignos. Nos tumores malignos, as células perdem a capacidade de aderência mútua, invadem os vasos e são levadas pelo sangue e pela linfa, indo colonizar órgãos distantes (metástases).

Embora não se conheçam ainda todos os detalhes dos mecanismos de ação dos oncogenes, começa a emergir das pesquisas até agora realizadas um quadro geral das atividades destes genes. Está bem estabelecido que os oncogenes atuam através de proteínas que normalmente influenciam a proliferação celular. Essas proteínas, codificadas pelos proto-oncogenes (em condições normais) e pelos oncogenes (no câncer), podem ser divididas em quatro categorias: 1) os fatores de crescimento; 2) os receptores de membrana para estes fatores; 3) as proteínas intracelulares que influenciam certos processos celulares quando os receptores para os fatores de crescimento são ativados (proteínas transdutoras do sinal); e 4) os fatores nucleares que regulam a transcrição do DNA para RNA.

A atividade normal desses quatro grupos de proteínas já foi sumariamente explicada neste livro. Os fatores de crescimento, como, por exemplo, o fator de crescimento para a epiderme ou *epidermal growth factor*, EGF, são captados pelas células que possuem receptores para o fator, e respondem com um aumento ou reinício da proliferação celular. O sinal, no caso o fator de crescimento para a epiderme, tem especificidade porque somente as células epiteliais possuem os respectivos receptores e, portanto, somente elas respondem ao mencionado fator de crescimento. Ao se combinarem com o fator epidérmico de crescimento, os receptores acionam as proteínas transdutoras intracitoplasmáticas que produzem mensageiros intracelulares. Estes penetram no núcleo e ativam fatores de transcrição do DNA, aumentando a síntese de certos tipos de RNA, principalmente os mRNA necessários para a síntese das proteínas essenciais para a formação de mais protoplasma e multiplicação das células.

As quatro classes de proteínas mencionadas participam do desenvolvimento normal dos tecidos, porém, quando alteradas pelos oncogenes, levam ao câncer. Como, durante o desenvolvimento embrionário, a produção de novas células é um processo muito ativo e necessário para o rápido crescimento do embrião, a atividade destas classes de proteínas, na maioria das células, é máxima na vida intra-uterina.

Já foi demonstrado que modificações nos proto-oncogenes para cada uma das quatro categorias de proteínas relacionadas com a proliferação celular podem originar câncer, embora raramente se tenham observado modificações nos genes para as proteínas do grupo 1 (fatores de crescimento). As evidências mostram que a maioria dos oncogenes deriva dos proto-oncogenes

do grupo 3 (transdutores intracitoplasmáticos). Quanto às proteínas do grupo 4 (fatores nucleares de transcrição), elas acabam sofrendo a ação de todos os oncogenes, porque a cancerização acarreta necessariamente um aumento dos tRNAs, rRNAs e dos mRNAs, essenciais para o aumento da síntese protéica associada ao crescimento e proliferação das células cancerosas.

Controle da expressão gênica na etapa de tradução

Existe consenso geral no sentido de que, nas células procariontes, o controle da atividade dos genes tem lugar principalmente durante a transcrição, quando se formam os RNAs mensageiros que codificam as diversas proteínas celulares. Todavia, nas células eucariontes, além do controle na transcrição, existem mecanismos de controle dos produtos gênicos (proteínas) no momento da tradução e, até mesmo, após a tradução.

O controle gênico na tradução é freqüente nas células eucariontes, porque nestas células há necessidade de maior flexibilidade na regulação dos genes, o que é fácil de compreender considerando-se a variedade de tecidos e de órgãos que constituem o corpo dos seres eucariontes. O assunto está longe de ser esclarecido, mas parece que existem três mecanismos para o controle gênico traducional em eucariontes: 1) Modulação por fatores protéicos que participam da síntese de proteínas, principalmente os fatores de inciação. 2) Modulação pela variação e estabilidade do mRNA. Os diferentes mRNAs têm estabilidade muito variável. De modo geral, os mRNAs mais abundantes nas células são mais estáveis do que os mRNAs que aparecem no citoplasma em pequenas quantidades. É vantajoso para a célula que os mRNAs para as proteínas relacionadas com as funções especializadas da célula tenham vida mais longa. Os mRNAs para o colágeno, por exemplo, são abundantes e relativamente estáveis nos fibroblastos, células especializadas na produção de colágeno. Um exemplo interessante de modificação na estabilidade do mRNA é encontrado nas células da glândula mamária. O mRNA para a caseína, principal proteína do leite, se torna muito lábil, isto é, sua vida média se reduz drasticamente, quando cessa a produção do hormônio hipofisário prolactina, que é estimulador da produção de leite para a amamentação. 3) Modulação através da inativação do mRNA no citoplasma. O exemplo mais conhecido é dado pelos óvulos do ouriço-do-mar. O óvulo não fertilizado contém muito mRNA, porém inativo e podendo ser mantido assim durante meses, não ocorrendo síntese protéica. Esta síntese recomeça, com grande intensidade, alguns minutos após a penetração do espermatozóide (fertilização) que ativa o mRNA armazenado no citoplasma. O mecanismo molecular desta ativação do mRNA do óvulo pelo espermatozóide não está elucidado completamente.

Sumário

A atividade gênica das células, expressa pela transcrição dos diferentes tipos de RNA e pela síntese de proteínas, ocorre durante a intérfase, sendo praticamente inexistente durante a divisão. Embora o conjunto gênico de um determinado organismo seja, em geral, o mesmo para todas as suas células, hoje está bem demonstrado que as diferentes células desempenham as suas funções especializadas por processos que envolvem a ativação e inativação diferencial de baterias ou conjuntos gênicos determinados. Vários mecanismos são conhecidos mediante os quais é exercido um controle sobre a ativação de genes específicos em diferentes células. Nos procariontes, *o controle é exemplificado pelo modelo do* óperon, *no qual substâncias específicas induzem a atividade de certos conjuntos de genes. Em cada óperon, existe um gene regulador, o qual produz um repressor que inativa o segmento operador do óperon. Quando inativado, o operador não permite a transcrição dos genes estruturais. A substância indutora reage com a repressora, que perde afinidade para o DNA, possibilitando a inserção da RNA-polimerase, o que libera o segmento de DNA operador. Este, quando em atividade, permite a transcrição dos genes estruturais, os quais vão, assim, sintetizar RNAs mensageiros que serão traduzidos nas proteínas enzimáticas específicas do óperon.*

Nas células eucariontes, o controle da expressão gênica é muito complexo. O controle da transcrição de DNA em RNA é feito por proteínas que constituem o complexo regulador *que atua sobre o segmento nucleotídico denominado* promotor, *que, como nas células procariontes, ativa ou desativa determinado gene.*

Os cromosomas politênicos e plumosos são gigantes e permitem o estudo microscópico da transcrição gênica

O processo de transcrição é extremamente difícil de visualizar, devido ao tamanho reduzido dos cromosomas. Mais precisamente, por este processo ocorrer na intérfase, quando os cromosomas estão distendidos e, portanto, invisíveis no microscópio óptico. Todavia, existem cromosomas gigantes, que podem ser observados tanto no microscópio óptico como no eletrônico. Trata-se dos cromosomas **politênicos**, presentes em células de larvas de insetos dípteros, onde a transcrição ocorre durante a intérfase, e os cromosomas **plumosos**, onde se observa transcrição durante a prófase da meiose dos óvulos. Esses cromosomas gigantes, devido a suas particularidades, representam material precioso para o estudo da relação da estrutura dos cromosomas com a sua fisiologia.

Cromosomas politênicos

Certos dípteros apresentam, em sua fase larvária, alguns tecidos que possuem cromosomas gigantes em seus núcleos interfásicos. Desses tecidos, as glândulas salivares são aquelas que apresentam cromosomas mais desenvolvidos, sendo, por isso, os mais estudados. A observação das células dessas glândulas mostrou que são enormes e contêm também um núcleo volumoso. Apesar de o núcleo estar em intérfase, notam-se, em seu interior, formações alongadas, em forma de cordões que se coram: são os **cromosomas politênicos** (Fig. 9.9). Estes são excepcionalmente grandes, chegando a 0,5 mm e, portanto, visíveis a olho nu. Seu conteúdo de DNA é muito alto, podendo ultrapassar mil vezes o conteúdo do cromosoma normal do mesmo animal. Cada cromosoma gigante está formado por grande número de filamentos paralelos, daí o nome de politênicos (*polis*, muito, *tainia*, fio ou fita). A interpretação mais aceita sobre a formação dos cromosomas politênicos admite que os cromosomas normais

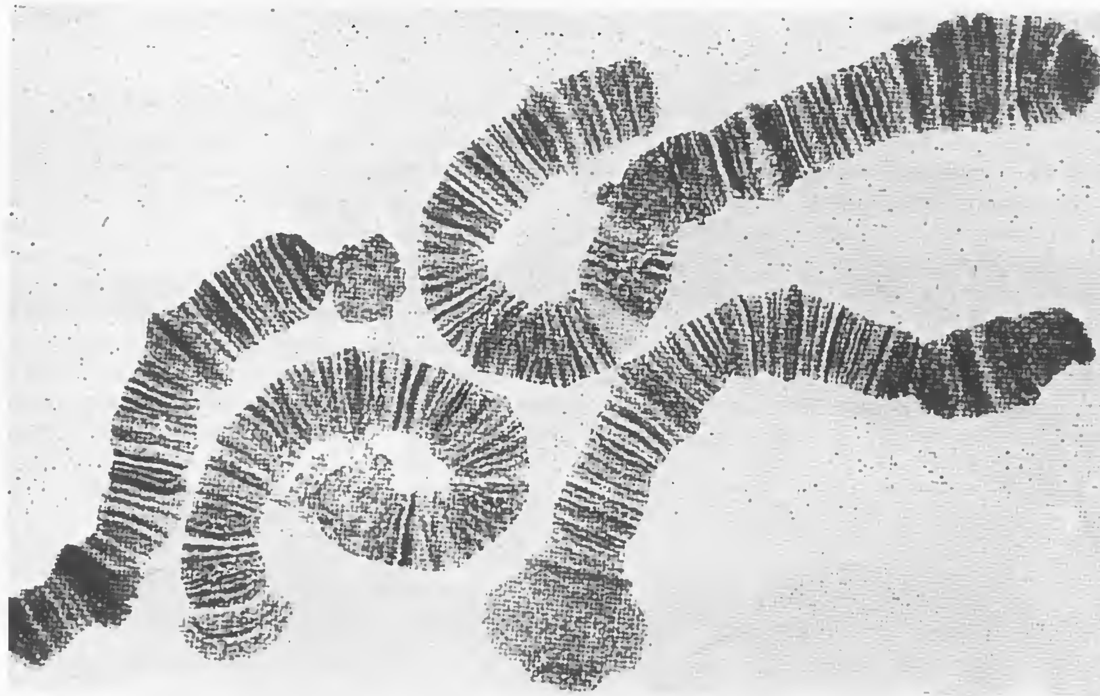


Fig. 9.9 Fotomicrografia de cromosomas politênicos de núcleo interfásico das glândulas salivares do inseto díptero *Rhynchosciara angelae*. Apesar de ser um núcleo interfásico, os cromosomas são bem visíveis devido à politenia. Cada cromosoma é constituído por inúmeras faixas claras e escuras alternadas. Coloração pela orceína lactoacética. 1.200 ×. *(Cortesia de J. M. Amabis.)*

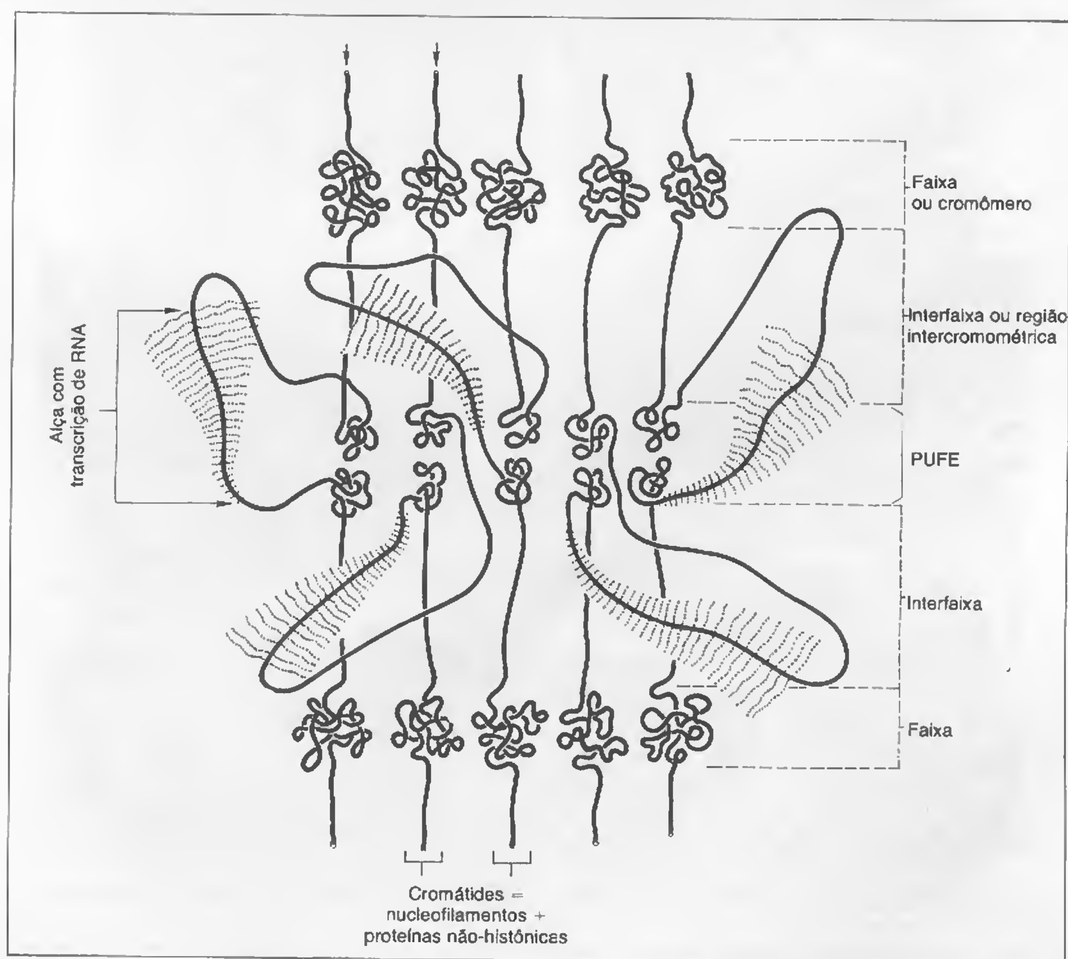


Fig. 9.10 Desenho esquemático mostrando a estrutura de um cromosoma politênico com um pufe. As faixas escuras representam regiões em que o filamento de DNA se condensa mais do que nas faixas claras. O pufe representa uma estrutura cujos filamentos se desenrolam formando alças.

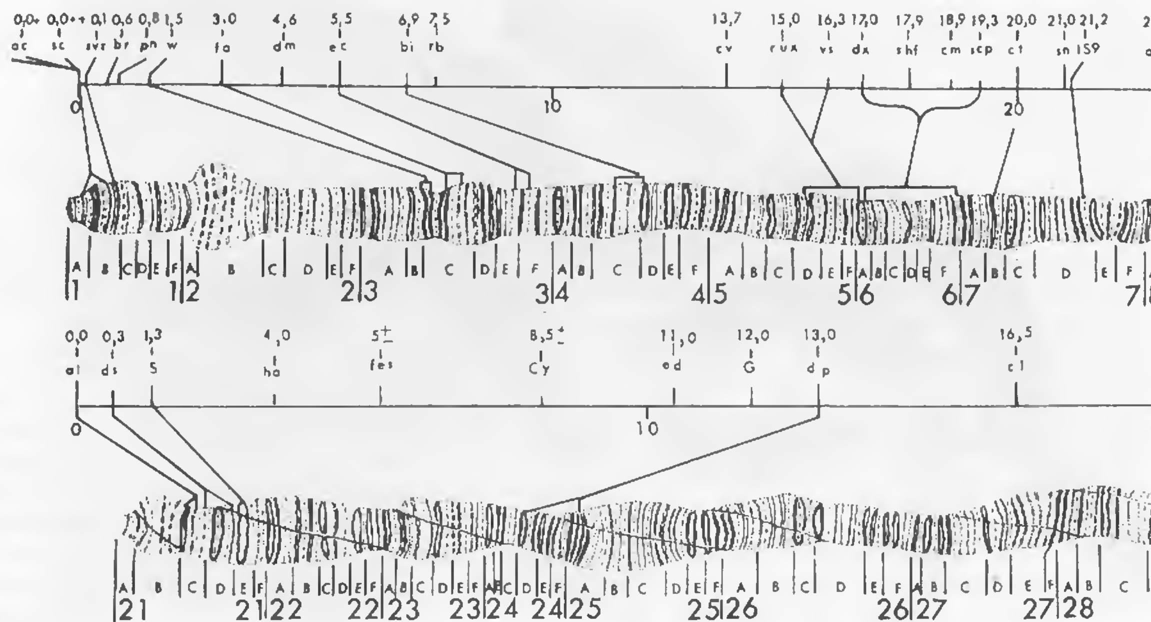


Fig. 9.11 Desenho ilustrando segmentos de dois cromosomas politênicos da glândula salivar de larva da mosca *Drosophila melanogaster*. Observe-se a alternância de faixas claras e escuras que representam regiões em que os filamentos estão mais condensados alternando-se com outros menos condensados. Tanto as faixas claras e escuras, portanto, contêm DNA; o que varia é o seu grau de condensação. Admite-se que cada faixa escura contenha um ou mais genes. Os números e letras representam a nomenclatura usada no estudo das faixas. Um cromosoma politênico tem, em média, entre 2.000 a 3.500 faixas. *(De R. C. King. Genetics. Oxford University Press. New York, 1965. Reprodução autorizada.)*

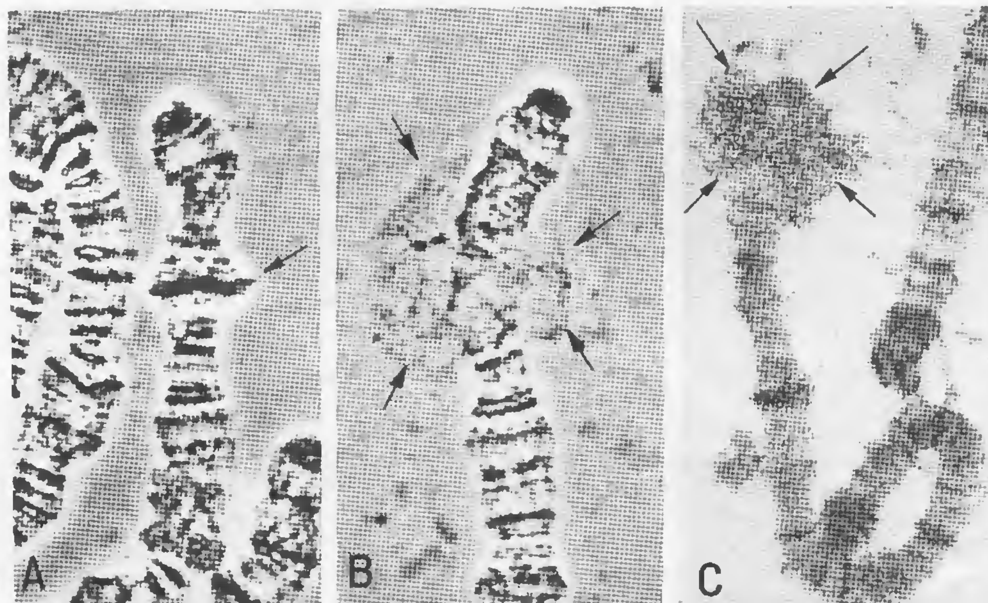


Fig. 9.12 Fotomicrografia de cromosomas de *Rhynchosciara angelae*. Em **B**, um pufe de DNA em fase de expansão na extremidade do cromosoma (*setas*). Em **A**, a mesma região após a regressão do pufe. Nota-se que a faixa correspondente ao pufe (*seta*) está maior que as faixas vizinhas. Isto se dá devido à síntese adicional e localizada de DNA que ocorreu no pufe (amplificação gênica). **A** e **B** corados pela orceína lactoacética. 1.200 ×. (*De J. M. Amabis, L. C. G Simões. Genética 42:404, 1971, Reprodução autorizada.*) Em **C**, radioautografia de cromosoma de animal injetado previamente com uridina H^3. Observe o acúmulo de grãos de prata na região de um pufe de RNA (setas), indicando intensa síntese deste composto. O mesmo seria observado em pufe de DNA se fosse injetada timidina H^3 no animal. 1.200 ×. (*Cortesia de D. C. Amabis.*)

dessas células se desespiralizam em certos tecidos, adquirindo aspecto filamentoso. Nessa fase, os cromossomas homólogos se emparelham longitudinalmente da mesma maneira que os dois componentes de um fecho ecler, e seus nucleofilamentos ou cromátides se multiplicam repetidamente. O resultado final é a produção de células gigantes cujo núcleo apresenta, em vez de 2n, apenas n cromossomas. Cada cromossoma apresenta-se, pois, constituído por um eixo de DNA associado a proteínas histônicas e não-histônicas. O fato de se tratar de cromossomas gigantes permitiu que se relacionassem, nos cromossomas politênicos, de maneira excepcionalmente favorável, dados morfológicos com outros genéticos, fisiológicos e evolutivos.

Esses cromossomas apresentam nítidas faixas transversais, escuras e claras, que se alternam (Fig. 9.9). Estas diferenças de densidade se devem a diferentes quantidades de nucleoproteína em cada cromátide, bem como ao enovelamento do filamento cromossômico nessas regiões (cromômeros). As faixas transversais se formam graças ao perfeito registro com que se associam os filamentos (cromátides) no cromossoma politênico.

Entre as faixas ou **cromômeros**, constituídos por DNA condensado, aparecem em regiões claras: as **interfaixas**, constituídas por segmentos não-condensados de DNA (Fig. 9.10). Admite-se que 95% do DNA estejam nas faixas e apenas 5% nas interfaixas.

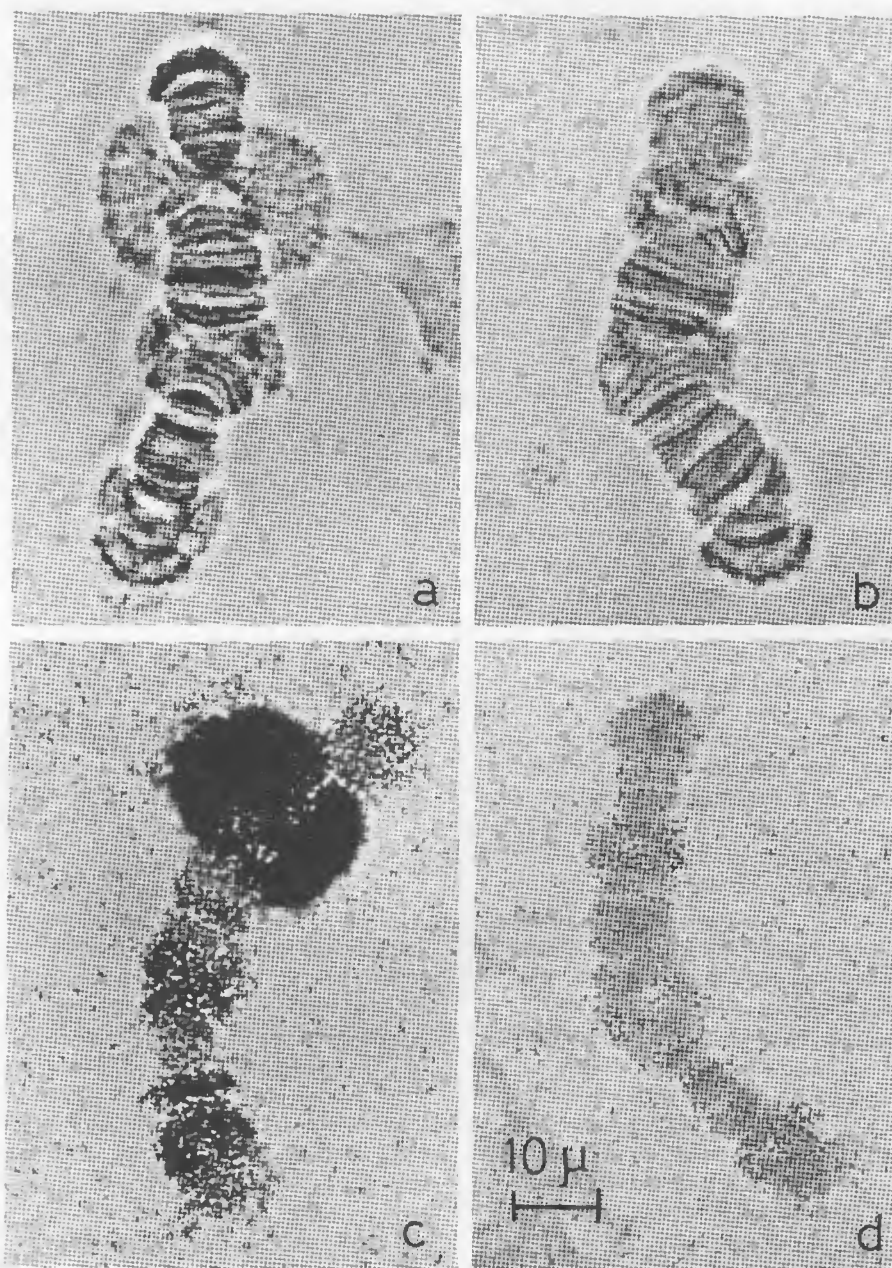


Fig. 9.13 Relação entre pufe e síntese de RNA em cromossoma politênico de *Chironomus*. *a)* Controle — cromossoma mostrando três grandes pufes (ou anéis de Balbiani). Observe o acentuado desenvolvimento do anel superior. *b)* Colapso dos pufes, 20 minutos depois da injeção com actinomicina, um inibidor da síntese de RNA (transcrição). *c)* e *d)* Radioautografias de cromossomas tratados como em *a* e *b* após injeção de uridina tritiada (precursor de RNA). Intensa síntese de RNA em *c* e sua supressão em *d* devido à ação da actinomicina.

O tamanho e a disposição das faixas são característicos e constantes para cada cromossoma. Além disso, a disposição dessas faixas num determinado cromossoma é a mesma em diferentes tecidos. Por meio de técnicas citogenéticas, foi possível localizar muitos genes nas faixas (Fig. 9.11).

A análise dos cromossomas politênicos durante a evolução da larva mostrou que, periodicamente, algumas faixas densas sofrem desespiralização do DNA e ficam mais facilmente visíveis no microscópio, formando estruturas chamadas de pufes. Cada pufe (alguns pufes morfologicamente especiais receberam o nome de anéis de Balbiani) é constituído por numerosas alças dos nucleofilamentos ou cromátides, resultantes da desespiralização de parte do DNA presente em uma faixa. O estudo radioautográfico dos pufes demonstrou um aumento de síntese de RNA nessas estruturas, razão pela qual se coram mais intensamente e são mais facilmente visíveis (Figs. 9.12 e 9.13). É interessante observar que o aparecimento dos pufes apresenta um padrão específico em cada tecido, aparecendo cada um com uma cronologia própria. Pode-se demonstrar também que determinados pufes estão relacionados com a produção de determinados tipos de secreção das glândulas salivares. Os fatos mencionados sugerem fortemente que os pufes ricos em RNA são a manifestação morfológica da atividade de transcrição dos seus genes e, em outras palavras, correspondem à intensa produção de RNAs mensageiros específicos.

Outros pufes, menos freqüentes, apresentam alta síntese e teor elevado de DNA, processo este que precede uma onda de síntese de RNA. Esses pufes são atualmente considerados resultantes de um processo de ativa replicação gênica localizada, com a provável finalidade de amplificar especificamente certos genes, permitindo a sua expressão de maneira mais ampla. Trata-se, portanto, do equivalente morfológico de um processo de **amplificação gênica**. Como já foi dito, o ritmo de formação e desaparecimento dos pufes é específico para cada tecido. Recentemente, descobriram-se vários fatores capazes de alterar este ritmo, acelerando ou retardando o aparecimento dos pufes. Os fatores que apresentam este efeito são de natureza variada, e estudos realizados *in vitro* e *in vivo* mostram que simples modificações da dieta (como a adição da galactose), da temperatura (choque térmico) ou da composição salina do meio podem alterar o ritmo de aparecimento dos pufes. Sem dúvida, o fator que mais chamou atenção até o momento é o hormônio da muda dos insetos, chamado **ecdisona**. Esta substância, produzida na glândula prototorácica dos dípteros, tem marcado efeito sobre o controle do ciclo das larvas e formação da pupa nestes insetos. A injeção deste hormônio em larvas jovens desencadeia o aparecimento de pufes que normalmente só apareceriam mais tarde, no momento da pupação, época em que atua a ecdisona produzida pela própria larva. Evidentemente, trata-se de um exemplo onde é possível observar o equivalente morfológico da ativação de genes por um hormônio. Calcula-se que apenas 10 a 15% do DNA dos cromossomas politênicos estejam se expressando ao mesmo tempo nos pufes, estando o restante do genoma inativo.

Em resumo, os cromossomas politênicos permitem o estudo acurado da transcrição não só do ponto de vista qualitativo (quais os genes em atividade) e quantitativo (quantos genes estão em atividade), como também cinético (em que época aparecem os pufes, a sua duração e época de regressão).

Cromossomas plumosos

Esses cromossomas (Figs. 9.14 e 9.15) aparecem da prófase da meiose dos ovócitos de certos animais, sendo mais estudados nos anfíbios por se tratar de material de fácil manuseio devido ao fato de terem células e cromossomas grandes. Nessa prófase, os ovócitos se encontram em rápido crescimento e seus cromossomas se apresentam longos e com uma série de projeções laterais chamadas alças. Cada cromossoma está formado por dois filamentos — as cromátides —, nucleofilamentos onde regiões densas se alternam com outras menos densas. Estes dois filamentos correspondem aos dois cromossomas homólogos que se acoplam durante a meiose. São cromossomas grandes (1,5 mm de comprimento) que se apresentam formados por regiões bem coradas — **os cromômeros** — e separados por espaços claros — **regiões intercromoméricas**. Os cromômeros correspondem a regiões onde ocorre um enovelamento do filamento de cromatina, ao passo que, na região intercromomérica, o filamento não se apresenta enovelado.

Alguns desses cromômeros se desespiralizam e o seu nucleofilamento forma uma alça em cada cromômero, ficando, pois, o cromossoma com duas alças simétricas, uma de cada lado,



Fig. 9.14 Desenho ilustrando o aspecto de parte de um par de cromossomas plumosos do urodelo *Triturus viridescens*. Vêem-se duas regiões por onde se prendem entre si estes cromossomas, na meiose. São os quiasmas (setas). Na região da seta dupla, observa-se uma porção de cromossoma onde os seus dois filamentos constituintes se separam. Este aspecto demonstra que o cromossoma nesta fase é constituído por dois nucleofilamentos (cromátides). *(Baseado em estudos de J. Gall.)*

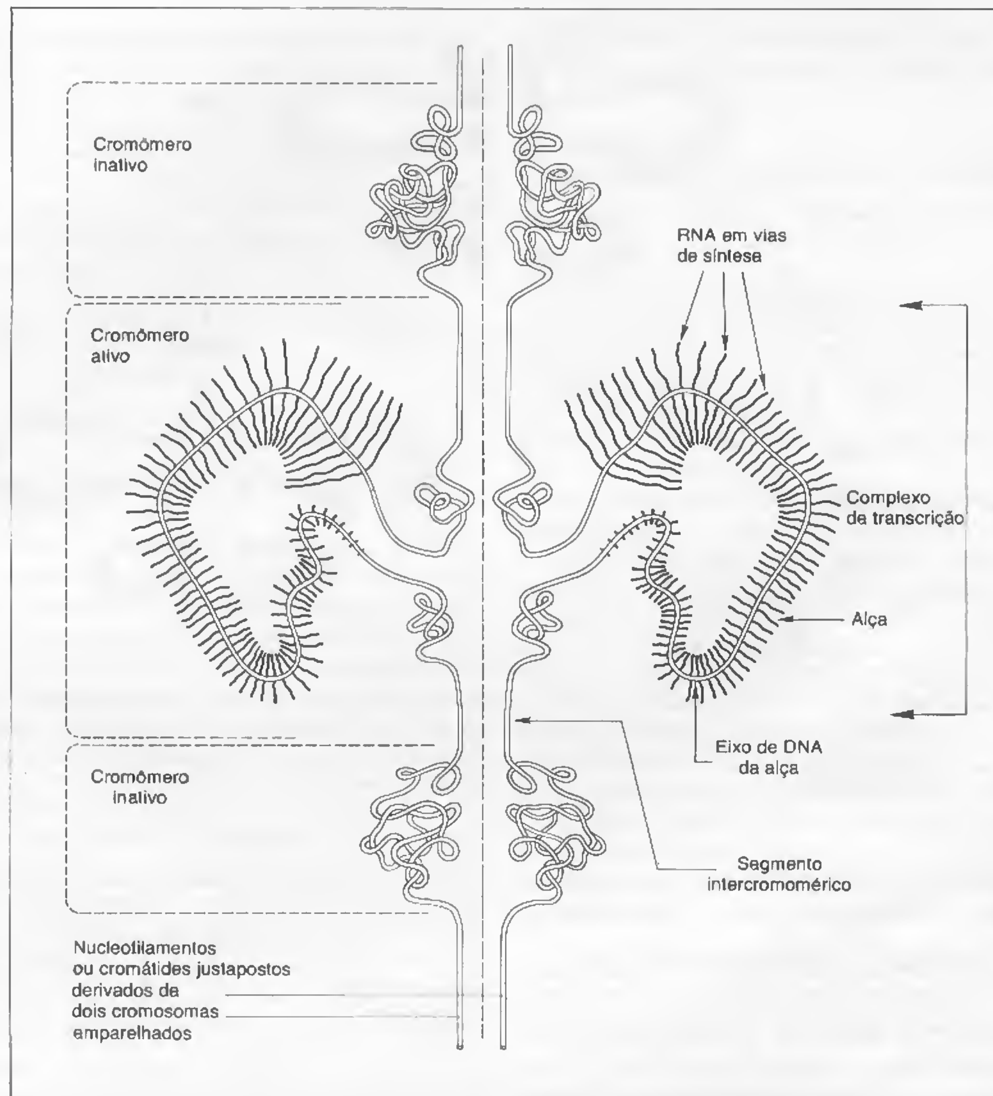


Fig. 9.15 Esquema ilustrando a estrutura de um cromosoma plumoso. Observe que os nucleofilamentos dispostos paralelamente apresentam regiões cromoméricas unidas por segmentos intercromoméricos. Alguns cromômeros apresentam parte do seu nucleofilamento desespiralizado e em intensa fase de transcrição de RNA (cromômero ativo). *Redesenhado de Berkaloff* et al. Biologie et Physiologie Cellulaires. *Herman ed., Paris 1981.*

oriundas dos cromômeros presentes em cada um dos nucleofilamentos (Figs. 9.14 e 9.15). O conjunto dessas alças empresta aos cromosomas o aspecto de uma escova para limpar vidro de candeeiro, resultando daí o seu nome em inglês: *lampbrush chromosome.*

Os estudos histoquímicos e radioautográficos desses cromosomas demonstraram que os nucleofilamentos são formados por DNA, mas que, na região das alças, ocorrem intensa síntese e acúmulo de RNA. O tratamento desses cromosomas com RNAse elimina este ácido nucléico acumulado nas alças, permanecendo, porém, a integridade dos filamentos, enquanto o tratamento com DNAse não remove o RNA acumulado nas alças, mas fragmenta o nucleofilamento em diferentes regiões (Fig. 9.16). Admite-se que as alças desses cromosomas são genes em estado ativo sintetizando RNA intensamente. Neste sentido seriam homólogos aos pufes dos cromosomas politênicos, só que aqui há duas alças por cromômero, visto existirem apenas dois nucleofilamentos no cromosoma. O aparecimento dos cromosomas plumosos coincide com a fase do ovócito durante a qual ocorre intenso crescimento com o aparecimento de centenas de nucléolos associados à superfície interna do envoltório nuclear. Os estudos ultra-estruturais realizados neste período sugerem uma intensa transferência de RNA do núcleo para o citoplasma. Cada nucléolo apresenta um anel de DNA que se supõe originado por replicação do organizador nucleolar. Estas réplicas circulares formam o molde para a síntese de RNA ribosômico. Esse processo representa, portanto, uma considerável amplificação dos locais de síntese de RNA ribosômico.

Esse grande número de nucléolos (Fig. 9.17) tem como função a síntese de RNA que se acumula no óvulo. O acúmulo é necessário, pois, no desenvolvimento embrionário, antes da gástrula, os processos de síntese protéica ocorrem à custa de ribosomas previamente acumulados no óvulo. Depois da prófase meiótica, os cromosomas plumosos voltam à sua morfologia meiótica normal. Neste sentido se diferenciam dos cromosomas

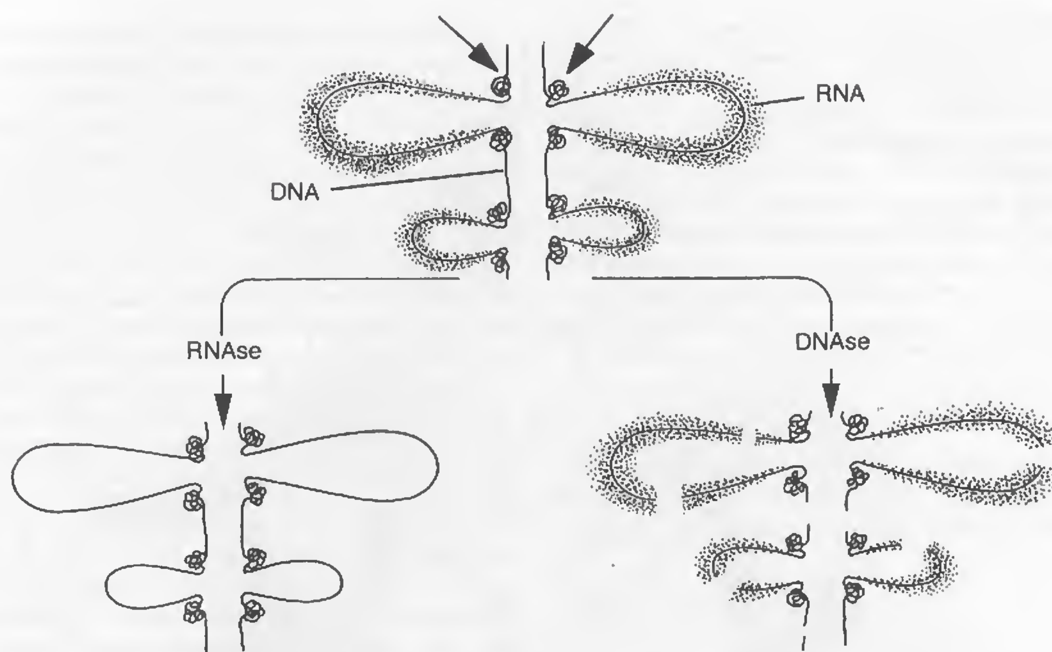


Fig. 9.16 Desenho ilustrando a estrutura e composição química de um segmento de cromosoma plumoso. Ele é constituído por dois filamentos que apresentam regiões enoveladas (setas) que podem alternar com regiões onde o filamento se expande lateralmente, formando alças recobertas por RNA. A enzima RNAse digere o RNA, deixando as alças nuas (**esquerda**), enquanto a DNAse rompe os filamentos sem alterar o RNA (**direita**).

politênicos, que são estáveis morfologicamente, apenas desintegrando-se, da mesma forma que todo o tecido, durante a metamorfose do inseto.

Comparando os cromosomas politênicos com os plumosos, verifica-se que os politênicos se caracterizam por uma intensa multiplicação dos seus nucleofilamentos, nos quais ocorre a transcrição de vários genes durante a intérfase. Estes genes contêm informação necessária para o trabalho dia a dia das células das larvas dos dípteros, como, por exemplo, a síntese de enzimas digestivas, enzimas e proteínas que participam na pupação e síntese de proteínas estruturais. Contrastando com os cromosomas politênicos, os plumosos dos ovócitos transcrevem durante a

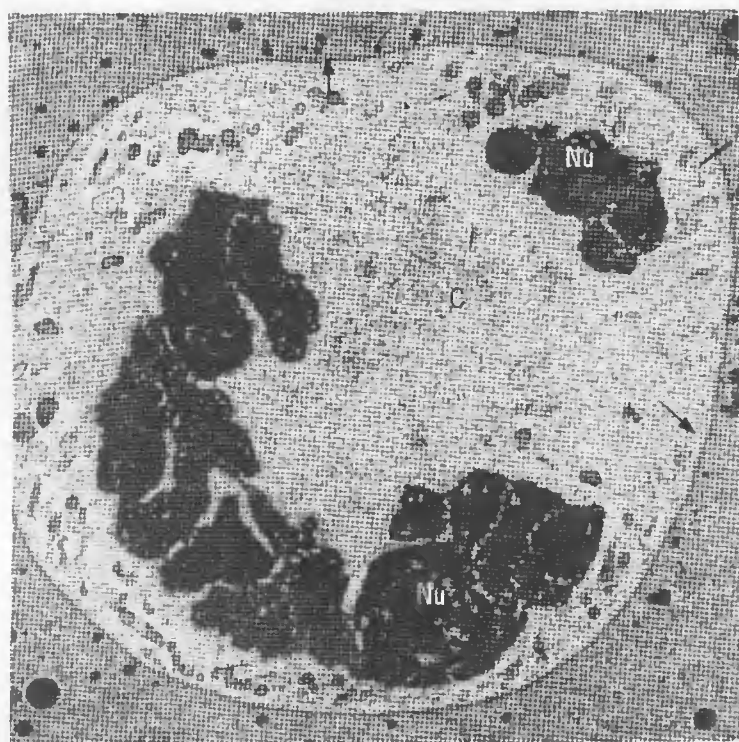


Fig. 9.17 Eletromicrografia do núcleo de ovócito imaturo do camarão rosa (*Pendeus paulensis*). Observem-se o acúmulo de material nucleolar (Nu), a cromatina frouxa e o envoltório nuclear (*setas*) 3.000 ×. (*Cortesia de T. Worsmann.*)

prófase da meiose. Esta transcrição está dirigida principalmente no sentido de fornecer material macromolecular para ser acumulado no óvulo, assim é que já foi neles demonstrada a transcrição de RNA ribosômico e RNA mensageiro para a síntese de histonas. Histonas e ribosomas são componentes essenciais dos óvulos, pois atendem às necessidades do embrião durante a fase de segmentação, época na qual se observam intensa síntese de DNA e síntese de algumas proteínas que participam nas mitoses e nenhuma síntese de RNA.

Sumário

Os cromosomas, na grande maioria dos organismos, são visíveis apenas durante a divisão do núcleo, etapa do ciclo celular em que estão altamente condensados e não apresentam atividade gênica. Durante a intérfase, época de intensa atividade gênica, os cromosomas estão descondensados e, portanto, não discerníveis individualmente na massa da cromatina nuclear. Duas exceções existem, na intérfase e na prófase da meiose, onde cromosomas gigantes são encontrados: os cromosomas politênicos *e os* cromosomas plumosos. *Os cromosomas politênicos ocorrem em vários tecidos de alguns organismos, porém os mais comuns e estudados são aqueles das células das glândulas salivares de insetos dípteros. Esses cromosomas originam-se por um processo de endorreplicação, pelo qual os cromonemas duplicados ficam juntos, em paralelo, transformando o cromosoma num feixe de filamentos. Esses cromosomas apresentam regiões transversais mais espessas, que se coram intensamente — as faixas ou bandas —, alternadas com regiões menos densas, que se coram menos intensamente — as interfaixas ou interbandas. As bandas originam-se pela justaposição dos cromômeros homólogos existentes nos inúmeros filamentos que compõem o cromosoma. Essas bandas podem sofrer, em épocas específicas da vida do organismo e, também, em diferentes tecidos, uma desespiralização, provocando um intumescimento localizado no cromosoma. Essas estruturas foram denominadas de pufes e são locais onde ocorre uma intensa síntese de RNA. Os pufes, com seu padrão cronológico específico, são a manifestação morfológica da atividade gênica diferencial. Em alguns, pode ocorrer um aumento desproporcional da quantidade de DNA por um processo de amplificação gênica. Hoje, já se conhecem vários dos mecanismos que regulam a atividade de alguns desses pufes. Os casos mais estudados são dos pufes que ocorrem próximo à pupação e cuja formação é regulada pela* ecdisona, *o hormônio da muda dos insetos. Os cromosomas plumosos são facilmente reconhecíveis, nos ovócitos de anfíbios, graças ao seu grande tamanho. Apresentam-se aos pares, pois ocorrem na final da prófase I da meiose, estágio em que o emparelhamento dos cromosomas ainda é visível, pelo menos nas regiões dos quiasmas. Cada cromosoma do par é formado por dois filamentos (duas cromátides), pois nessa fase os cromosomas estão duplicados. Cada fio apresenta regiões densas — cromômeros — e regiões distendidas — as alças. Nas alças ocorre intensa síntese de RNA e, como elas existem e estão ativas segundo um padrão determinado, representam genes específicos em atividade. Desta forma, as alças são o equivalente morfológico dos pufes dos cromosomas politênicos. A região organizadora do nucléolo nos cromosomas plumosos dos ovócitos de anfíbios sofre amplificação de seus genes. Este DNA amplificado destaca-se do cromosoma, e cada segmento, em forma de anel, organiza seu próprio nucléolo. Assim, formam-se centenas de nucléolos associados à superfície interna do envoltório nuclear.*

Através da engenharia genética pode-se modificar o genoma da célula

O termo engenharia genética, no seu sentido mais amplo, compreende uma série de procedimentos utilizados para modificar o genoma de um organismo. Esta tecnologia consiste, basicamente, na introdução, num organismo qualquer, de segmentos de DNA normalmente não-existentes no seu genoma (DNA exógeno), de maneira que estes segmentos sejam aí replicados, transcritos e traduzidos.

Em princípio, a engenharia genética pode ser realizada em todos os seres vivos, desde as bactérias até o homem, e tem finalidades muito variadas. É possível, por exemplo, modificar o genoma de bactérias com a finalidade de induzi-lo a produzir, em quantidades comerciais, proteínas específicas e de uso médico, como por exemplo, a insulina e o hormônio do crescimento humanos. Procura-se também modificar o genoma de plantas, tornando-as mais produtivas e mais resistentes às doenças.

A engenharia genética tem também aplicação potencial na reintrodução, no organismo, de genes cuja falta (devido a mutações) é causa de certas doenças na espécie humana.

A seguir serão descritas algumas técnicas empregadas em engenharia genética.

Técnica de hibridização molecular

A técnica de hibridização molecular, descrita sumariamente na Fig. 9.18, é de grande utilidade em biologia, pois, entre outras aplicações, permitiu determinar quantitativamente, por método bioquímico, a homologia (semelhança) existente entre o DNA de espécies diferentes. Nos vertebrados, por exemplo, foi demonstrada a forte hibridização entre o DNA dos antropóides e do homem (> 90%), e verificou-se que ela decresce à medida que se desce na escala filogenética dos mamíferos aos répteis, anfíbios e peixes. A homologia entre o DNA de peixes e o do homem é apenas de 20%. Esses dados deram um sólido apoio bioquímico à teoria da evolução e têm permitido uma série de estudos sobre pormenores da evolução dos seres vivos.

Outra utilidade da hibridização molecular é o seu emprego para quantificar o número de cópias de uma determinada seqüência específica de DNA existente em uma célula, pois a quantidade de material radioativo hibridizado é proporcional ao número de seqüências existentes. Por esta técnica foi possível saber que os genes do RNA ribosômico e das histonas estão presentes nas células em cópias múltiplas, ao passo que os genes para colágeno e enzimas digestivas têm apenas uma cópia por célula.

A técnica da hibridização tem também sido muito usada para a localização de segmentos específicos de DNA nos cromosomas, através do que se chama de **hibridização *in situ***. Nesta variante, cariótipos cujos cromosomas foram previamente achatados em lâmina são submetidos ao calor com conseqüente separação das cadeias do seu DNA. Incuba-se, então, estes cromosomas com uma solução de DNA específico, radioativo e já fundido (isto é, da cadeia única), por um tempo determinado em condições nas

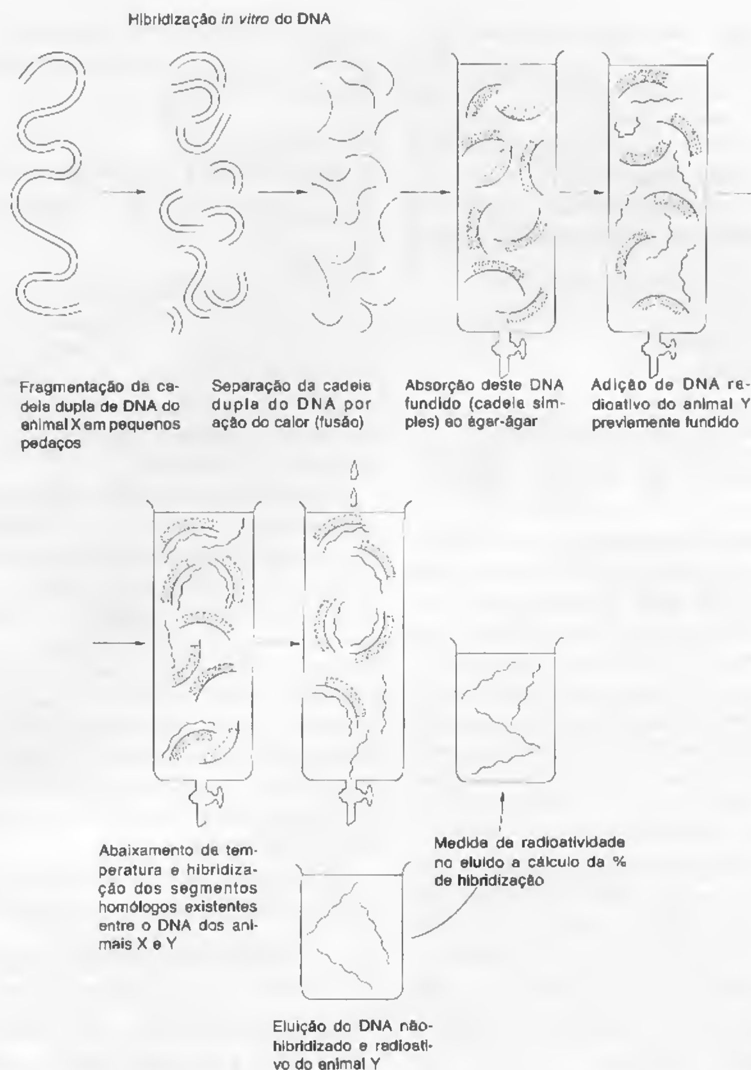


Fig. 9.18 Técnica de hibridização de DNA usada em biologia molecular.

quais ocorre a hibridização. Após a hibridização, lava-se o preparado, retirando-se o excesso de DNA radioativo, e realiza-se, na lâmina, o processo de radioautografia, que indicará, nos cromosomas, qual o local em que está localizado o DNA em questão. A hibridização *in situ* pode também ser feita usando-se RNA radioativo, o qual vai associar-se às regiões cromosômicas que apresentam DNA com seqüência de bases complementares no RNA utilizado.

O emprego das transcriptases

As técnicas de hibridização descritas no item anterior fazem uso de **sondas** de detecção específicas que são seqüências puras de DNA ou RNA, de constituição conhecida, tornadas radioativas e utilizadas para localizar e quantificar seqüências homólogas em cadeias longas de DNA. Para a produção destas sondas, foi importante o estudo das **transcriptases**, enzimas que produzem DNA sobre uma matriz também de DNA, e das **transcriptases reversas**, capazes de produzir DNA sobre uma matriz de RNA. As sondas são muito utilizadas para a determinação quantitativa e a localização de seqüências determinadas de DNA ou RNA nas células pelo processo de hibridização já visto aqui.

Endonucleases de restrição

As endonucleases de restrição, ou simplesmente enzimas de restrição, têm a capacidade de reconhecer pequenas seqüências de nucleotídeos nos filamentos duplos de DNA, cortando o DNA em locais altamente específicos de ambos os filamentos. Essas enzimas existem em bactérias, de onde são isoladas para uso laboratorial. Seu nome deriva da função exercida na bactéria, que é destruir o DNA dos vírus, criando uma **restrição** à propagação dos invasores. As enzimas de restrição que já foram isoladas e purificadas permitem o reconhecimento de mais de 100 seqüências nucleotídicas de numerosas bactérias.

Clonagem gênica

Consiste na reprodução de seqüências de DNA em outros organismos (principalmente bactérias), produzindo-se, assim, artificialmente, uma amplificação gênica. A Fig. 9.19 informa, sumariamente, a seqüência dos passos necessários para esse procedimento.

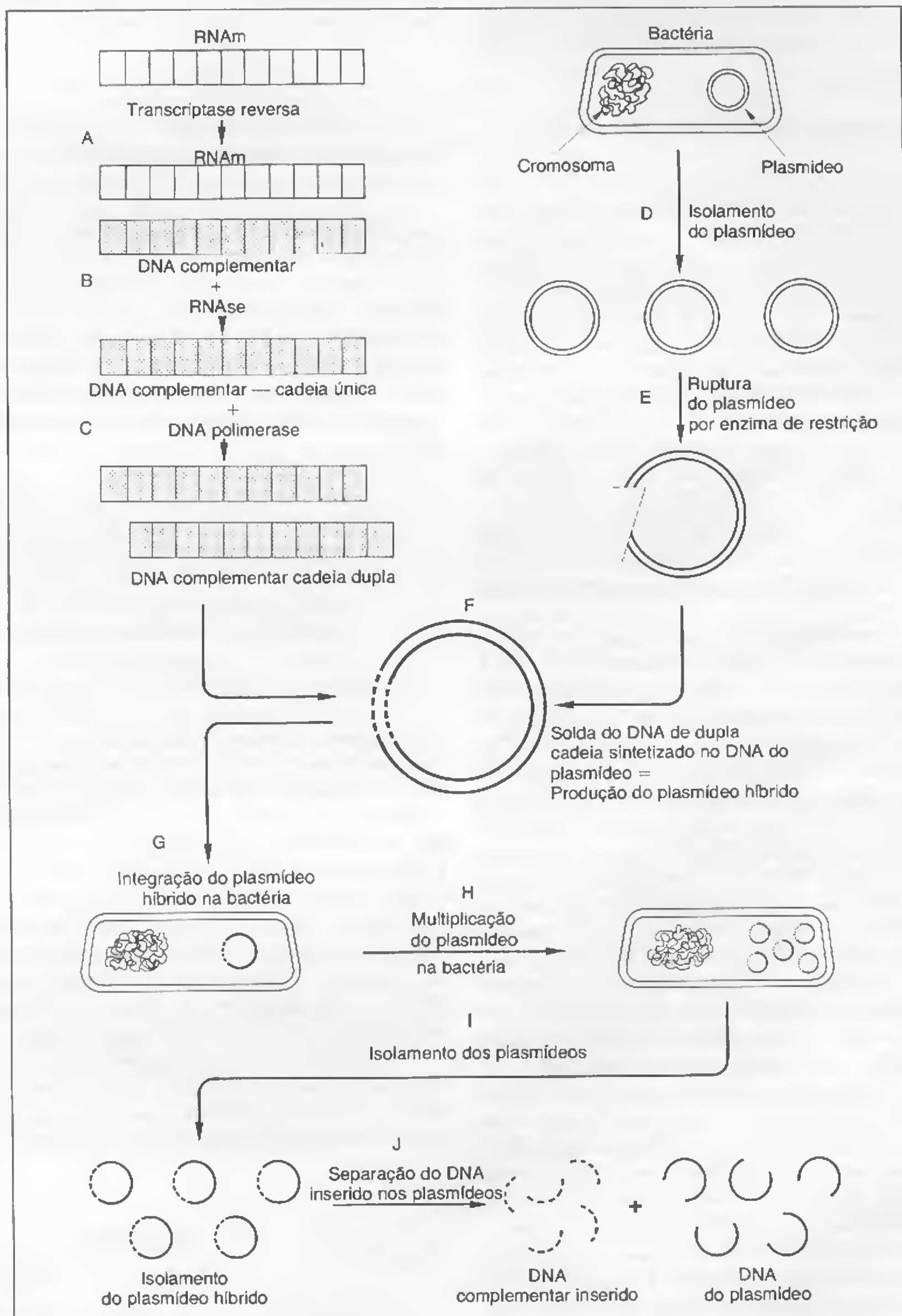


Fig. 9.19 Esquema ilustrando resumidamente o procedimento utilizado para a clonagem de um gene em bactéria. O procedimento parte de um RNA mensageiro que serve de molde para a síntese do DNA homólogo (**A**), produzindo um híbrido RNA-DNA. A porção de RNA do híbrido é eliminada (**B**), ficando uma cadeia simples de DNA que é duplicada (**C**). Esta cadeia dupla de DNA é inserida em um plasmídeo (**F**) que foi isolado a partir de bactérias previamente infectadas (**D**) e aberto por ação de uma enzima de restrição apropriada (**E**). O plasmídeo híbrido resultante é introduzido em bactérias, nas quais se reproduz. Na etapa seguinte, os plasmídeos são isolados e as seqüências específicas de DNA sintetizadas são deles separadas, graças à ação de enzimas de restrição adequadas. É possível, em seguida, marcar este DNA com isótopos radioativos, produzindo, assim, o que se chama de uma sonda de detecção, que, por hibridização, é capaz de quantificar (quando se trabalha *in vivo*) ou localizar a seqüência específica de DNA (gene) nas células, quando se faz a hibridização *in situ*.

A molécula de DNA contendo seqüências de DNA provenientes de mais de um organismo é chamada **DNA recombinante.** As técnicas que utilizam DNA recombinante são muito numerosas e variáveis, e têm trazido grande progresso ao estudo da biologia molecular.

Multiplicação de segmentos de DNA pela técnica PCR

A técnica PCR (***Polymerase Chain Reaction***) possibilita a clonagem de genes com enorme eficiência, em comparação com a clonagem feita através de plasmídeos que são introduzidos em bactérias. A técnica PCR só é possível graças às DNA-polimerases cuja atividade enzimática não é destruída por temperaturas elevadas. Essas DNA-polimerases são extraídas de bactérias que vivem em fontes de água quente. A enzima usualmente empregada é obtida da bactéria ***Thermus aquaticus*** e, por isso, conhecida como Taq-polimerase.

A técnica PCR usa a Taq-polimerase para adicionar desoxirribonucleotídeos a um pequeno segmento de DNA, ou "primer", que dirige a síntese do novo segmento de DNA sobre o molde ("template") onde o "primer" se localizar. Portanto, é necessário que o "primer" usado se ligue especificamente à extremidade 3' do segmento de DNA que se deseja copiar, e não se prenda a outro local.

Para facilidade de exposição, a técnica PCR pode ser dividida em três etapas fundamentais. (1) A mistura da amostra de DNA + Taq-polimerase + "primers" é submetida a uma temperatura de 92°-94°C, para que ocorra a separação dos dois filamentos de DNA. (2) Abaixamento da temperatura para que os "primers" se prendam às extremidades 3' de cada filamento de DNA, que têm as seqüências nucleotídicas complementares dos "primers". É importante que exista grande excesso de segmentos "primers" para possibilitar as numerosas amplificações que ocorrerão nos ciclos posteriores da técnica. Nesta primeira etapa, a polimerase adiciona nucleotídeos às extremidades 3' dos "primers". À medida que a polimerase acrescenta nucleotídeos aos "primers", vai copiando os filamentos de DNA, formando filamentos complementares a cada um deles. (3) A temperatura é novamente elevada, causando a separação entre os filamentos de DNA novos e os filamentos antigos, e reiniciando o ciclo, porém agora os segmentos iniciais de DNA estão duplicados uma vez.

Em cada ciclo, o número de genes (segmentos de DNA) é duplicado e, como cada ciclo dura 2-3 horas, em algumas horas o DNA pode ser copiado bilhões de vezes. Além de rápida, PCR é uma técnica tão sensível que pode amplificar o DNA de uma única célula, como um glóbulo branco do sangue, por exemplo. Essa técnica tem numerosas e importantes aplicações em biologia molecular, em procedimentos de diagnóstico de diversas doenças hereditárias e em medicina forense. Ela torna possível identificar ou inocentar um suspeito de crime pela comparação do DNA de pequenas quantidades de sangue, esperma, ou um fio de cabelo, encontrados no local do crime, com o DNA da pessoa suspeita.

Visualização no microscópio eletrônico de macromoléculas e seus complexos

O aperfeiçoamento das técnicas de preparo de macromoléculas para sua visualização com o microscópio eletrônico permitiu o estudo da morfologia de segmentos de DNA, dos RNAs mensageiro, transportador e ribosômico. Tornou também possível a análise da interação de moléculas complementares de DNA com DNA (renaturação) e de DNA com RNA (hibridização), e o estudo da transcrição de DNA para RNA.

Os hibridomas permitem a produção, in vitro, *de uma proteína específica*

Além da engenharia genética, existem outros métodos de alterar o genoma e que estão sendo usados com resultados práticos em medicina, veterinária e biologia. À guisa de exemplo, será descrita a seguir uma das técnicas utilizadas com sucesso para a obtenção de quantidades comerciais de proteínas específicas e que é a ténica dos **hibridomas.** Esta técnica visa obter tipos celulares que produzem continuamente proteínas específicas em culturas de tecidos. Ela consiste basicamente nas seguintes etapas:

1.ª) Obter culturas de tecido de:
   - a) um tumor de plasmócitos (mieloma), cujas células se reproduzem rápida e continuamente e, ao mesmo tempo, sintetizam proteínas intensamente;
   - b) um tipo celular não-tumoral (portanto, que não se reproduz rapidamente), mas que produz uma proteína específica que se deseja obter pura e em quantidade comercial.

2.ª) Promover a fusão desses dois tipos celulares, obtendo-se um híbrido celular que se divide continuamente e produz a proteína específica desejada.

O processo de fusão consiste em misturar os dois tipos celulares e promover a fusão das células por meio de substâncias químicas ou de vírus que são adicionados à cultura. Após a fusão, as células híbridas sofrem um rearranjo do seu genoma com a eliminação de alguns cromosomas ou fragmentos de cromosomas, resultando daí algumas células com a característica de reprodução contínua e intensa síntese protéica (das células do tumor) associada à produção da proteína desejada (das células não-tumorais). Essas células são selecionadas e, a partir delas, obtém-se uma linhagem de células (o hibridoma) que produz, indefinida e ativamente, a proteína desejada.

A obtenção de hibridomas a partir do processo de fusão celular já saiu da fase experimental e já está sendo utilizada para produzir vacinas de uso médico. Essa técnica permite a obtenção de proteínas biologicamente ativas com grande grau de pureza.

Sumário

As modernas técnicas de análise e manipulação genética, associadas a métodos de análise bioquímica de ácidos nucléicos e de proteínas, estão permitindo que modificações sejam introduzidas nos genomas dos organismos. Esta metodologia, também conhecida como técnica do DNA recombinante *ou* engenharia genética, *consiste na introdução de genes de uma espécie em organismo de outra espécie, de modo que os genes estranhos possam duplicar-se, ser transcritos e traduzidos no novo ambiente celular. A metodologia é complexa e envolve numerosas técnicas, tais como: a hibridização molecular, onde ácidos nucléicos de duas espécies diferentes são associados, seja* in vitro, *com moléculas isoladas, ou* in situ, *quando o DNA ou o*

RNA de uma espécie é hibridizado com os cromossomas de outra espécie; o fracionamento do DNA com enzimas de restrição, *que cortam a molécula em sítios determinados; a visualização das macromoléculas no microscópio eletrônico etc. As técnicas permitem o isolamento e caracterização de genes específicos que são inseridos em vetores (geralmente plasmídeos de bactérias) e transferidos para células procariontes, nas quais, além da produção das seqüências de DNA em alto número, o produto final (geralmente proteínas) também é produzido em altas taxas, podendo até alcançar produção em escala industrial. Esses processos constituem o que se convencionou chamar de* clonagem gênica. *Outras técnicas, além do DNA recombinante, podem também alterar o genoma de células, permitindo, assim, conseguir linhagens celulares geneticamente modificadas e capacitadas a produzir determinados produtos em grande quantidade. Uma dessas técnicas, que utiliza células eucariontes, envolve a fusão de células provenientes de tumores com linhagens celulares não-tumorais, mas que produzem alguma proteína específica que se deseja. O híbrido celular irá reproduzir-se rapidamente e produzir a proteína desejada em grandes quantidades. Esta é a técnica do* hibridoma *ou de produção* monoclonal. *Está sendo largamente empregada na produção de vacinas, soros e outros anticorpos de aplicação na pesquisa e na medicina.*

Bibliografia

ARMELIN, H. *et al.* Fatores peptídicos de crescimento: bioquímica e biologia molecular. *In:* Meneghini, R. (ed.). *Biologia de Células em Cultura,* p. 95. Anais de IX Simpósio da Academia de Ciência do Estado de São Paulo, 1985.

ATWATER, J. A. *et al.* Regulated mRNA stability. *Ann. Rev. Genetics, 24:*519, 1990.

BEATO, M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell, 56:*335, 1989.

BERG, D. E. and HOWE (eds.) *Mobile DNA.* Am. Soc. Microbiology, 1989.

BLAU, H. M. Hierarchies of regulatory genes may specify mammalian development. *Cell, 53:*673, 1988.

BRAWERMAN, G. Determinants of messenger RNA stability. *Cell, 48:*5, 1987.

BREITBART, R. E.; ANDREADIS, A. and NADAL-GINARD, B. Alternative splicing: a ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. *Ann. Rev. Biochem., 56:*467, 1987.

CIEJEK, E. M.; TSAI M-J; O'MALLEY, B. W. Actively transcribed genes are associated with the nuclear matrix. *Nature, 306:*607, 1984.

DARNELL, J. E. *RNA. Sci. Am., 253*(4):68, 1985.

DARNELL, J. E. The processing of RNA. *Sci. Am., 249*(4):72, 1983.

DARNELL, J.; LODISH, H. & BALTIMORE, D. *Molecular Cell Biology,* 2nd ed. Sci. Am. Books, 1990.

DIACUMAKUS, E. G. Genetic enginneering in mammalian. Cells. *Sci. Am., 245:*60, 1981.

EARNSHAW, W. C. *et al.* Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome seaffolds. *J. Cell. Biol., 100:*1706, 1985.

FAWCETT, D. *The Cell.* 2nd ed. Saunders, 1981.

GEIDUSCHEK, E. P. Transcription by RNA polymerase III. *Ann. Rev. Biochem., 57:*873, 1988.

KOZAK, M. Regulation of translation in eucaryotic systems. *Ann. Rev. Cell Biol., 8:*197, 1992.

LEDER, P.; CLAYTON, D. A. and RUBENSTEIN. *Introduction to Molecular Medicine.* Sci. Am. Books, 1994.

NEWMEYER, D. D. and FORBES, D. J. Nuclear import can be separated into distinct steps *in vitro:* nuclear pore binding and translocation. *Cell, 52:*641, 1988.

TRENT, R. J. *Molecular Medicine. An Introductory Text for Students.* Churchill Livingstone, 1993.

WATSON, J. D. *et al. Recombinant DNA.* 2nd. ed. Sci. Am. Books, 1992.

10 Síntese de Macromoléculas

Roteiro

- *Com exceção do DNA, as macromoléculas celulares estão em constante renovação.*
- *A síntese de proteínas tem lugar nos polirribosomas, constituídos por uma molécula de RNA mensageiro e diversos ribosomas.*
- *Os polirribosomas podem estar livres na matriz citoplasmática ou presos às membranas do retículo endoplasmático rugoso.*
- *As células que produzem proteínas para o próprio protoplasma, como as células embrionárias e as tumorais, possuem muitos polirribosomas livres.*
- *Os polirribosomas presos ao retículo endoplasmático sintetizam proteínas para dentro das cisternas desse retículo.*
- *As modificações pós-traducionais das proteínas têm lugar nas cisternas do retículo endoplasmático rugoso e do aparelho de Golgi.*
- *Nas cisternas do retículo endoplasmático rugoso se inicia a glicosilação das glicoproteínas.*
- *Nas cisternas do aparelho de Golgi ocorrem glicosilações, sulfatações e fosforilações, para dar o acabamento final nas moléculas protéicas.*

Os componentes celulares são constituídos por moléculas complexas, em constante renovação, exceto o DNA, que é relativamente estável. É, pois, importante para a manutenção da estrutura celular a existência de mecanismos de síntese que forneçam continuadamente novas moléculas.

Além dos ácidos nucléicos, estudados em outro capítulo, as principais macromoléculas presentes nas células são as proteínas, os hidratos de carbono e os lipídios. Neste capítulo, serão analisados os principais componentes celulares que participam da síntese dessas moléculas e que serão mencionados a seguir.

1. Os polirribosomas, constituídos por uma molécula de mRNA e diversos ribosomas, onde se processa a tradução (síntese de moléculas protéicas).
2. O retículo endoplasmático, que é uma rede contínua de tubos, vesículas achatadas e vesículas esféricas, cuja parede é membranosa e cujo interior, ou **cisterna**, pode conter quantidade variável de material amorfo. Existem duas variedades, o retículo endoplasmático rugoso (RER) e o retículo endoplasmático liso (REL). O retículo rugoso apresenta polirribosomas aderidos à sua superfície; o retículo endoplasmático liso não tem polirribosomas.
3. O aparelho de Golgi, onde ocorrem modificações moleculares, empacotamento e endereçamento das proteínas sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso.

Os polirribosomas representam a maquinaria celular onde ocorre a tradução. Eles podem se encontrar livres no citoplasma ou aderidos ao retículo endoplasmático

O **polirribosoma** resulta da associação de uma molécula de mRNA com diversos ribosomas. O mRNA contém a seqüência de nucleotídeos que será traduzida, resultando na estrutura primária da proteína. Cada **ribosoma** é um complexo de diversas proteínas e alguns ácidos ribonucléicos, que se associam assumindo uma estrutura tridimensional apropriada para a tradução.

Os ribosomas se formam pela união de duas subunidades presentes no citosol, que se prendem ao mRNA no início da síntese protéica, formando assim os polirribosomas (também chamados de polisomas). Os polirribosomas podem apresentar-se aderidos ao retículo endoplasmático ou livres no citoplasma. Os polirribosomas livres (Fig. 10.1) são responsáveis pela síntese de moléculas protéicas essencialmente hidrofílicas que irão constituir:

a) o citosol ou matriz citoplasmática;
b) subunidades protéicas para certos componentes celulares, como os microtúbulos e microfilamentos; e
c) proteínas que serão incorporadas às estruturas que não sintetizam proteínas, como o núcleo e os peroxisomas, ou sintetizam apenas algumas de suas proteínas, como as mitocôndrias e os cloroplastos.

Os itens *a* e *b* representam proteínas que permanecem livres no citosol. Esse elenco de funções explica por que todas as células necessariamente têm polirribosomas livres no citoplasma. O número de polirribosomas livres geralmente não é grande e eles são pouco visíveis nas micrografias eletrônicas, pois são camuflados por outras estruturas mais abundantes nas células. Existem, porém, situações em que a síntese de proteínas para o citosol é tão intensa, que os polirribosomas constituem um componente citoplasmático dominante. Essa situação ocorre nos dois casos descritos a seguir.

1. Quando a célula é especializada para a síntese de um tipo de molécula protéica que exerce suas funções no citosol. É o caso do eritroblasto (célula precursora dos glóbulos vermelhos do sangue), que sintetiza muita hemoglobina. O cianoblasto, célula produtora de outro pigmento respiratório, a hemocianina, é outro exemplo (Fig. 10.2);
2. Em células que se reproduzem em ritmo acelerado, como células embrionárias ou de tumores de crescimento rápido; o citoplasma dessas células encontra-se cheio de polirribosomas, que sintetizam proteínas para o crescimento do citoplasma e do núcleo das células-filhas, após cada ciclo mitótico.

As cisternas do retículo endoplasmático rugoso (RER) segregam e promovem inúmeras transformações pós-traducionais nas moléculas protéicas

A síntese protéica nos polirribosomas aderidos ao retículo endoplasmático caracteriza-se por injetar, para dentro das cisternas do retículo, as cadeias polipeptídicas sintetizadas (Fig. 10.3), que assim ficam separadas do resto do citoplasma.

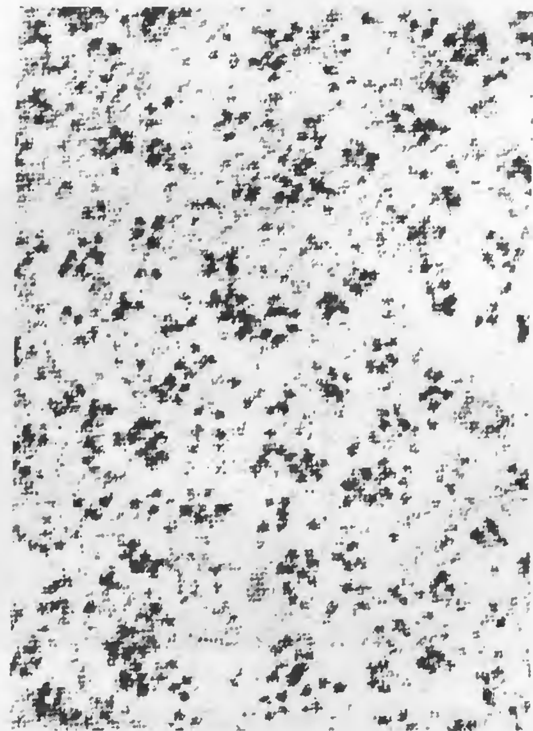


Fig. 10.1 Eletromicrografia de célula que sintetiza proteína mostrando os polirribosomas, que são grupos de ribosomas presos a uma molécula de RNA mensageiro. O RNA mensageiro que une os ribosomas não é visível neste preparado. 100.000 ×.

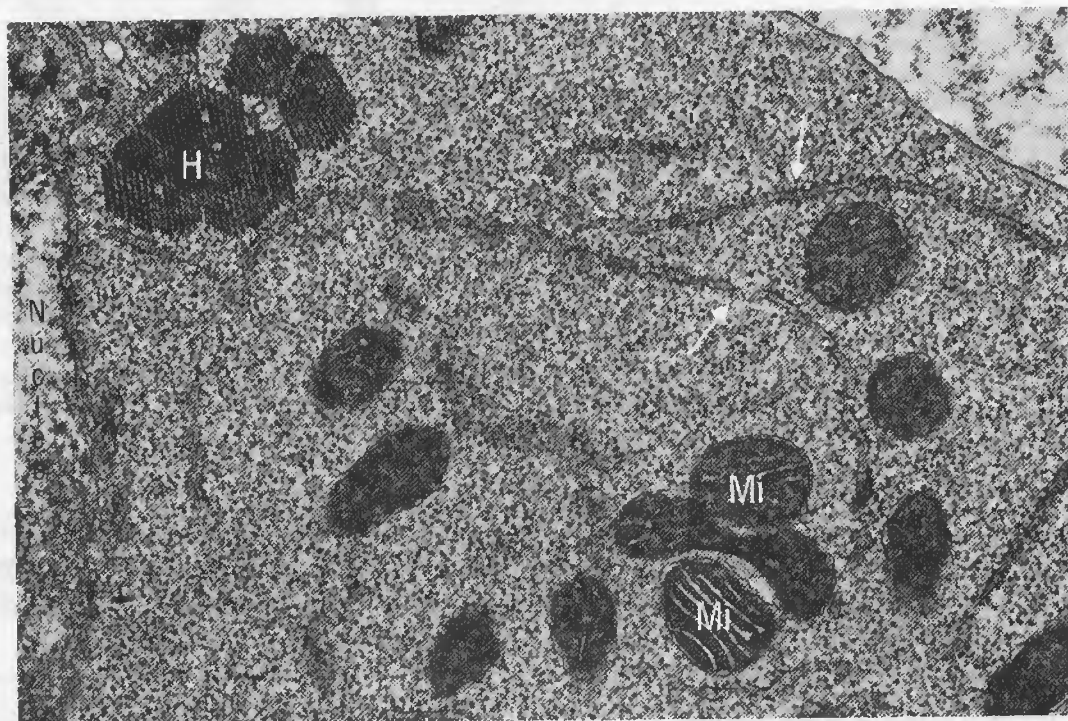


Fig. 10.2 Eletromicrografia de cianoblasto de *Limulus*. Essa célula produz um pigmento respiratório azul, a hemocianina. Na extremidade esquerda da ilustração, aparece pequena parte do núcleo celular. Em cima, também à esquerda, cristalóide do pigmento respiratório hemocianina (**H**). O citoplasma se apresenta cheio de polirribosomas, uma característica de célula que produz proteína para o citosol. As setas apontam vesículas achatadas de retículo endoplasmático rugoso, raras nessas células. À direita, embaixo, mitocôndrias com suas cristas características (**M**). 44.000 ×. (Cortesia de Fahrenbach, WH *J. Cell Biol., 44*:445, 1970. Reprodução autorizada.)

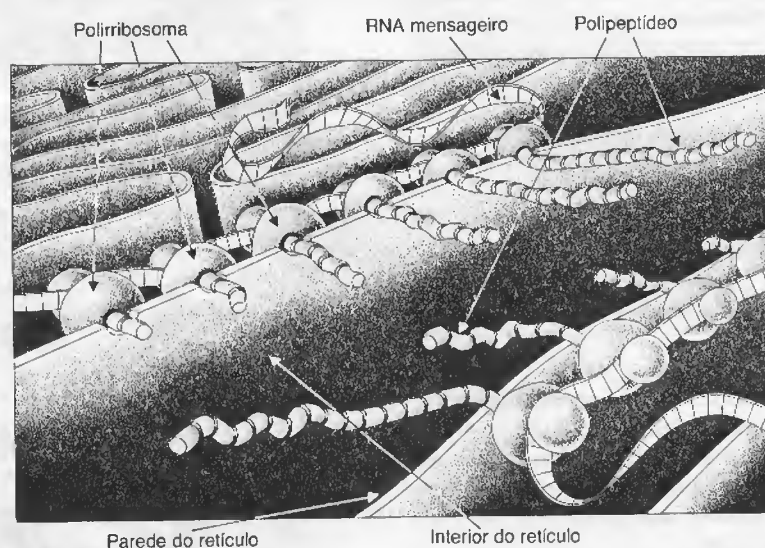


Fig. 10.3 Desenho ilustrando várias cadeias polipeptídicas atravessando a membrana do retículo endoplasmático rugoso e penetrando nas suas cisternas. Notar os ribosomas unidos entre si pelo RNA mensageiro. À medida que a molécula do RNA mensageiro se desloca ao longo da fileira de ribosomas, as cadeias polipeptídicas crescem para dentro da cisterna do retículo.

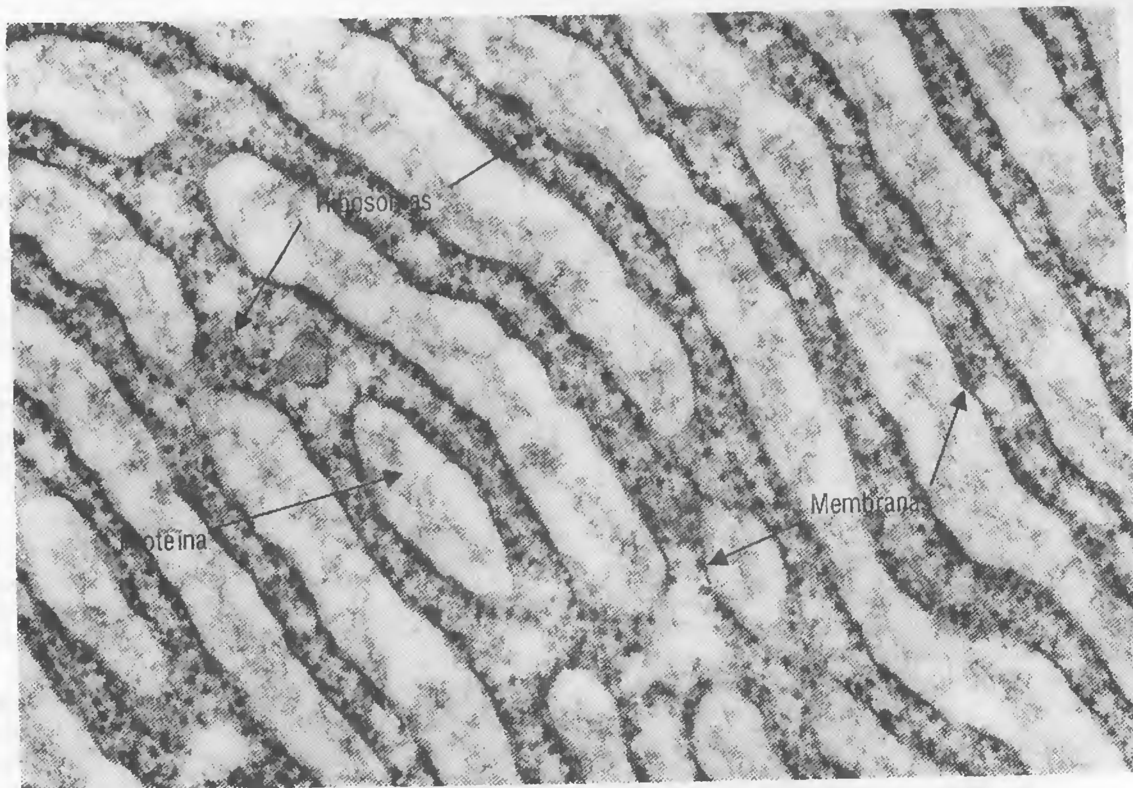


Fig. 10.4 Eletromicrografia de célula que sintetiza muita proteína, mostrando uma região em retículo endoplasmático rugoso. Essa organela é constituída por membranas, que apresentam ribosomas em contato com sua superfície externa (citosólica). As moléculas protéicas são sintetizadas para dentro das cisternas do retículo, onde aparecem como um material granuloso, em conseqüência da técnica empregada para preparar o corte da célula. 81.000X.

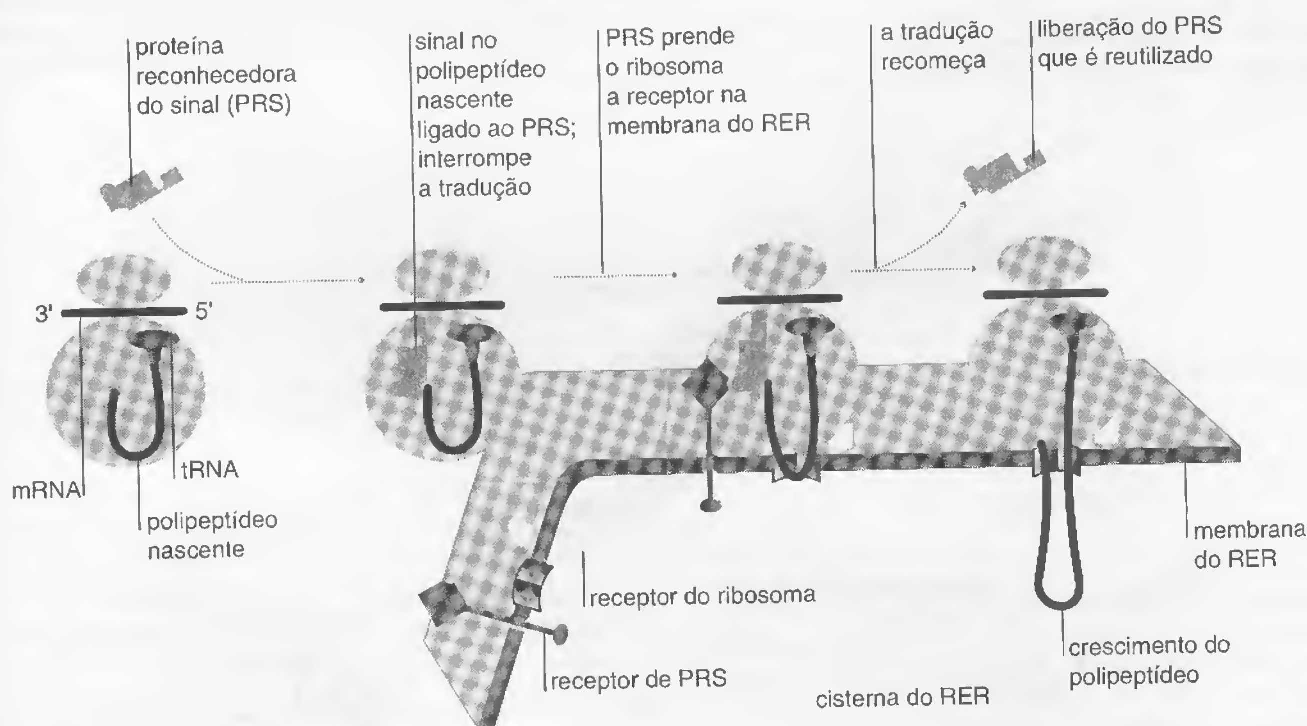


Fig. 10.5 Desenho esquemático simplificado mostrando a seqüência dos principais eventos que ocorrem durante a síntese protéica no RER. A síntese começa no citosol, porém é interrompida pela combinação d**proteína reconhecedora do sinal** (PRS) com o sinal que destina o polipeptídeo para a cisterna. A síntese recomeça quando o ribosoma e a proteína reconhecedora do sinal se prendem a seus respectivos receptores na membrana do retículo endoplasmático. O desenho não mostra, mas o sinal será cortado por proteases que estão dentro da cisterna. Quando a tradução recomeça, a proteína reconhecedora do sinal se desprende e volta para o citosol. Uma vez terminada a síntese do polipeptídeo, as duas subunidades do ribosoma se separam e se tornam aptas a traduzir novo RNA mensageiro.

O retículo endoplasmático rugoso tem morfologia variável, apresentando-se como vesículas membranosas que, quando muito numerosas, apresentam cisternas achatadas, e assumem o aspecto de lâminas paralelas (Fig. 10.4). A quantidade de retículo endoplasmático rugoso é diretamente proporcional à intensidade da síntese protéica e é um índice seguro para avaliar essa atividade na célula. O mecanismo pelo qual os polirribosomas aderem à membrana do retículo endoplasmático rugoso e introduzem na cisterna a molécula protéica sintetizada, é bastante complexo. A Fig. 10.5 dá uma idéia simplificada da seqüência dos seus principais eventos. Esse processo de injeção das proteínas nas cisternas do RER tem importância funcional, porque separa do citosol moléculas que se destinam a certas organelas ou, então, devem ser exportadas das células.

A penetração da proteína nascente nas cisternas do retículo endoplasmático rugoso tem lugar porque a molécula é sintetizada com um polipeptídeo sinal, que marca as cadeias protéicas que serão segregadas no retículo. Os polipeptídeos são, geralmente, formados com sinais que indicam seus destinos. O sinal para as cisternas do retículo rugoso é cortado por proteases existentes nas cisternas. Outros sinais podem permanecer na cadeia polipeptídica em formação, indo dirigir o polipeptídeo para locais específicos. Geralmente, os sinais são pequenas seqüências de aminoácidos situados na superfície molecular, quando a proteína assume sua configuração definitiva. Quando a cadeia está distendida, o sinal pode estar localizado na extremidade NH_2 ou na extremidade COOH. Algumas vezes, o sinal se localiza em mais de um local da molécula distendida, formando um agregado, quando a molécula protéica se dobra em sua forma tridimensional terciária (Fig. 10.6).

Uma vez dentro das cisternas do retículo endoplasmático rugoso, as cadeias polipeptídicas passam, no próprio RER e no complexo de Golgi, por uma série de modificações. O destino das proteínas sintetizadas nos polirribosomas e segregadas ou não no RER é variável: algumas permanecem no citoplasma e outras são exportadas, criando quatro tipos celulares gerais, descritos adiante e ilustrados na Fig. 10.7.

Células que sintetizam ativamente proteínas que não são segregadas nas cisternas do RER e permanecem no citosol. Como exemplo, podem ser citados os eritroblastos, as células embrionárias e as de tumores de crescimento rápido. Nesses casos, a síntese protéica tem lugar em polirribosomas livres, não presos ao retículo, que ocupam grande parte do citoplasma (Fig. 10.7**A**).

Células que sintetizam e segregam proteínas nas cisternas do retículo e exportam essas proteínas diretamente, sem acumulá-las em grânulos. Essas células e as mencionadas a seguir, que também segregam proteínas nas cisternas do retículo rugoso, apresentam os polirribosomas envolvidos nessa atividade presos à superfície externa do retículo rugoso. Elas apresentam o aparelho de Golgi desenvolvido, porém ausência de grânulos de secreção. São exemplos desse tipo celular os fibroblastos que secretam matriz extracelular, e os plasmócitos que secretam os anticorpos (Fig. 10.7**B**).

Células que sintetizam proteínas que são segregadas nas cisternas do RER, passam para o aparelho de Golgi e, depois, são acumuladas em grânulos que, geralmente, permanecem nas células para uso posterior. É o caso dos leucócitos eosinófilos, neutrófilos e monócitos, e dos macrófagos, que apresentam no citoplasma grânulos contendo proteínas e enzimas com diversas funções (Fig. 10.7**C**).

Células que sintetizam, segregam e acumulam proteínas em grânulos de secreção, que serão exportados por exocitose. São exemplos as células secretoras exócrinas do pâncreas e da glândula salivar parótida, que produzem enzimas digestivas empacotadas em vesículas ou grânulos envoltos por membrana que, sob o estímulo apropriado, serão secretados para digerir os alimentos (Fig. 10.7**D**).

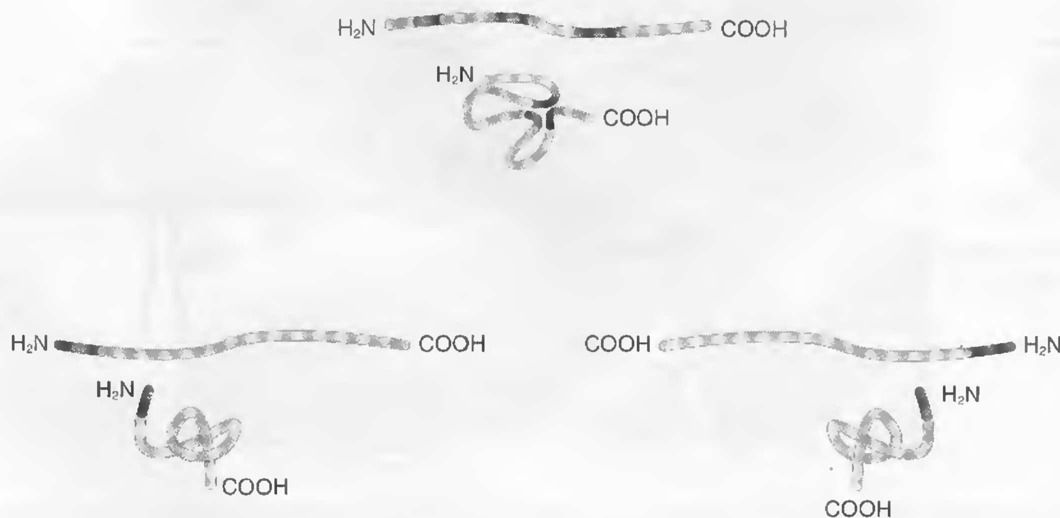


Fig. 10.6 Esquemas de moléculas protéicas distendidas, para melhor compreensão, e dobradas em sua configuração normal. O sinal que determina o destino da molécula está indicado por uma região preta, mostrando que ela pode se localizar numa das extremidades ou em vários pontos ao longo da molécula. Todavia, quando o polipeptídeo se dobra, o sinal ocupa sempre uma posição superficial, onde pode ser facilmente reconhecido.

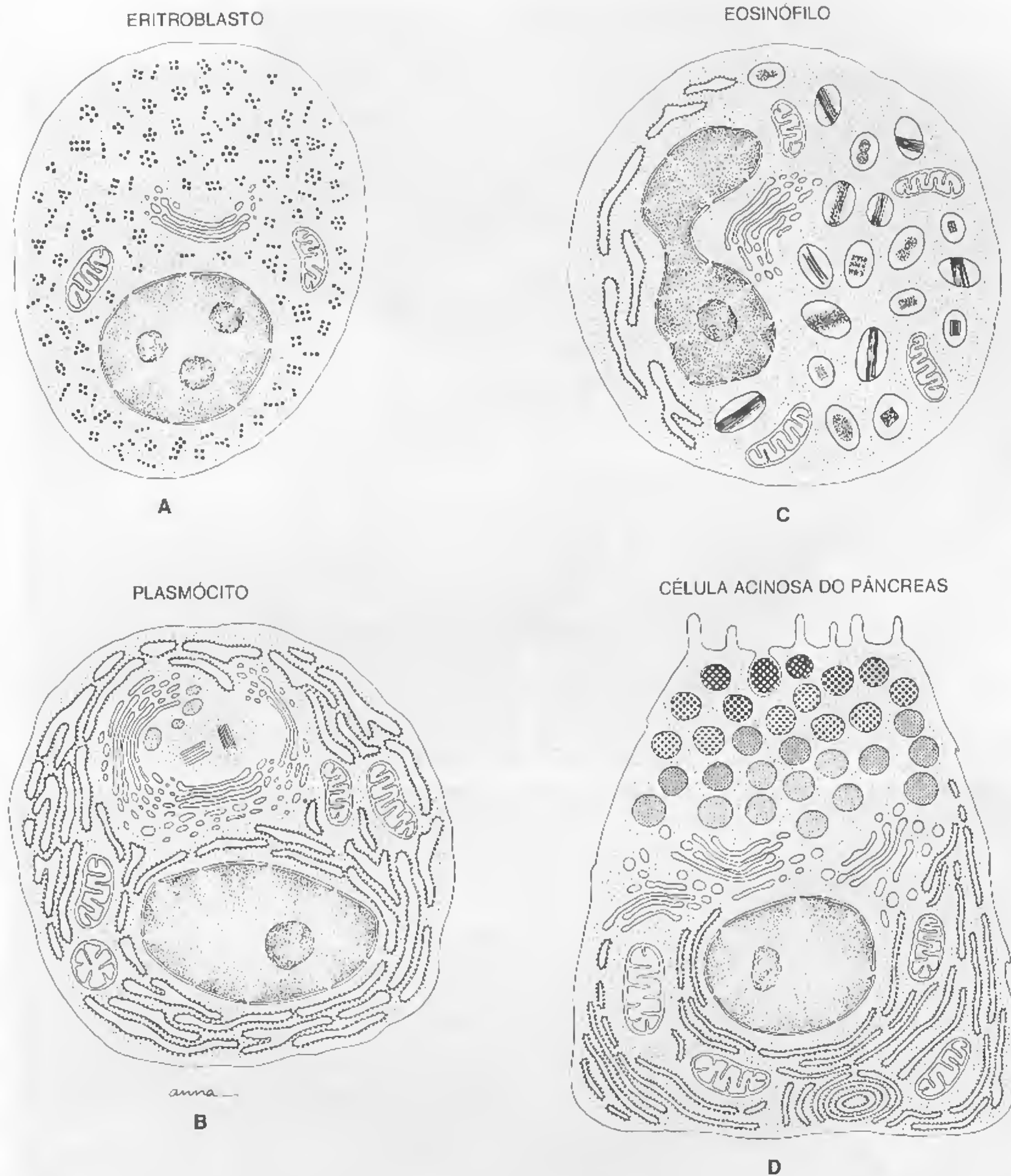


Fig. 10.7 Desenho esquemático ilustrando a ultra-estrutura característica dos quatro tipos gerais de células com intensa síntese protéica. A ultra-estrutura varia de acordo com o destino das proteínas sintetizadas. Explicação no texto.

No aparelho de Golgi ocorre o empacotamento dos produtos de secreção

No microscópio óptico, o complexo ou **aparelho de Golgi** aparece como uma estrutura enovelada única ou múltipla, de forma irregular (Fig. 10.8).

A localização do aparelho de Golgi é muito variada. Em geral único, localiza-se em uma região determinada do citoplasma, quase sempre ao lado do núcleo e perto dos centríolos (Fig. 10.9). Nas células secretoras, fica entre o núcleo e os grânulos de secreção. Em certas células, como nos neurônios, aparece sob a forma de vários agregados que circundam o núcleo. Seu tamanho varia muito, podendo ser pequeno, como no caso da célula muscular; médio, como no caso das células êntero-endócrinas (argentafins); e grande, como ocorre nas células que secretam glicoproteínas.

Com o microscópio óptico não foi possível o conhecimento da estrutura real do aparelho de Golgi. Mas isto se tornou possível com o advento da microscopia eletrônica (Figs. 10.10 e 10.11). Ele é formado por certo número de estruturas semelhantes a sacos membranosos, achatados e empilhados. A pilha de sacos apresenta-se curva, adquirindo o conjunto a forma de uma cuia, com uma face côncava e a outra convexa. O aparelho de Golgi é formado por membranas lisas, sem ribosomas. Essas membranas delimitam as **cisternas do aparelho de Golgi**.

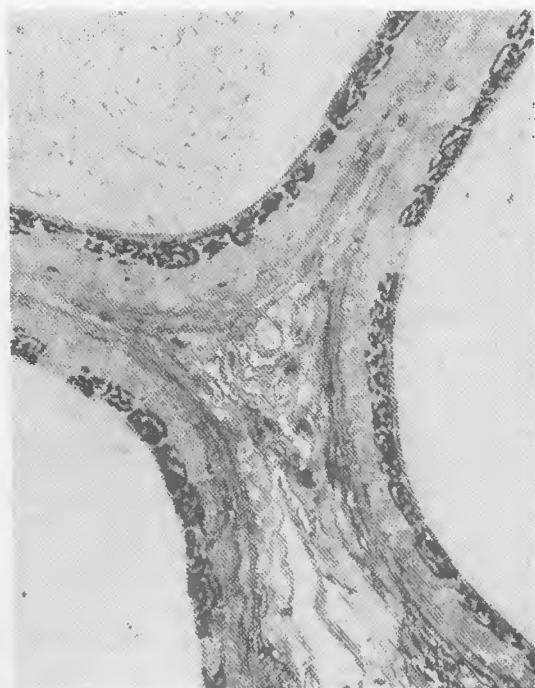


Fig. 10.8 Fotomicrografia de corte de epidídimo mostrando aparelhos de Golgi impregnados pela prata.



Fig. 10.9 Eletromicrografia de plasmócito. Essa célula produz glicoproteínas com a função de anticorpos. Note-se a abundância de retículo endoplasmático rugoso **(REG)**. As cisternas contêm proteínas, que aparecem como um material granuloso devido à técnica empregada. O núcleo apresenta, nitidamente, uma dupla membrana, e a face citoplasmática da membrana externa é revestida por ribosomas. A cromatina nuclear se condensa perto da membrana, respeitando o local dos poros nucleares **(setas)**. Acima do núcleo, um nítido aparelho de Golgi circular contendo centríolos **(C)** no seu interior (centro celular). Observar a presença de pequenas vesículas que afluem para as membranas do Golgi. Nas porções laterais do Golgi, notam-se vesículas dilatadas que se destacam das membranas do aparelho de Golgi **(setas)**. Trata-se de exemplo de uma célula que sintetiza e exporta, mas não acumula proteína. 40.000 ×.

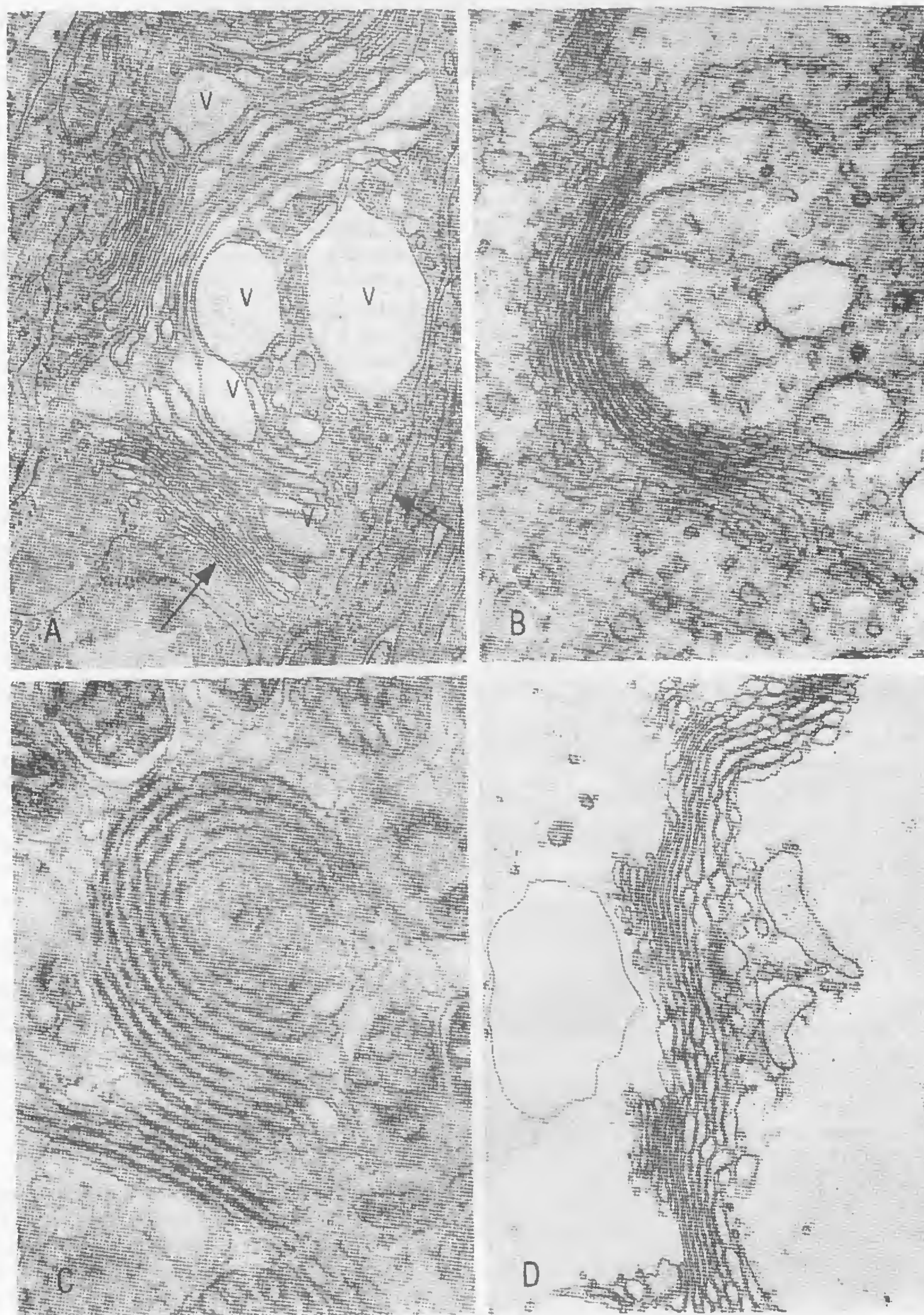


Fig. 10.10 Eletromicrografia de complexos de Golgi de vários tipos celulares. Em **A**, Golgi da célula secretora de muco (célula caliciforme do intestino). Observe-se o retículo endoplasmático rugoso que, em certas regiões, perde os ribosomas, transformando-se em retículo liso **(setas)**. Do lado esquerdo, vesículas transportadoras confluem para o aparelho de Golgi; do lado direito saem vesículas grandes **(V)**. 40.000 × Em **B**, Aparelho de Golgi de célula do testículo. Note-se como os sacos membranosos estão dispostos compactamente. 30.000 ×. Em **C**, Golgi de célula do córtex da glândula adrenal. Os sacos membranosos apresentam disposição concêntrica, as cisternas são extremamente reduzidas e as membranas apresentam-se fundidas em diversos locais. 30.000 ×. Em **D**, aparelho de Golgi isolado de célula mucosa do intestino. À esquerda convergem vesículas transportadoras, enquanto, do lado direito, emergem vesículas grandes. 20.000 ×.

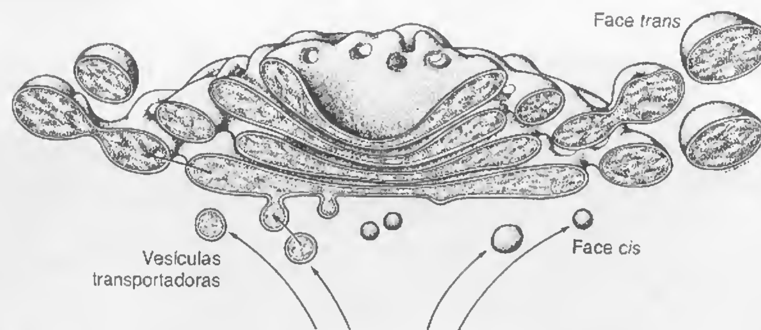


Fig. 10.11 Desenho mostrando a estrutura do aparelho de Golgi, que se apresenta constituído por sacos membranosos achatados e empilhados. Observem-se as vesículas pequenas originárias do retículo endoplasmático rugoso, por brotamento, que se aproximam da superfície convexa, fundindo-se a ela (vesículas transportadoras). Das bordas dilatadas da organela brotam vesículas grandes. O fluxo de moléculas sintetizadas segue a direção das setas.

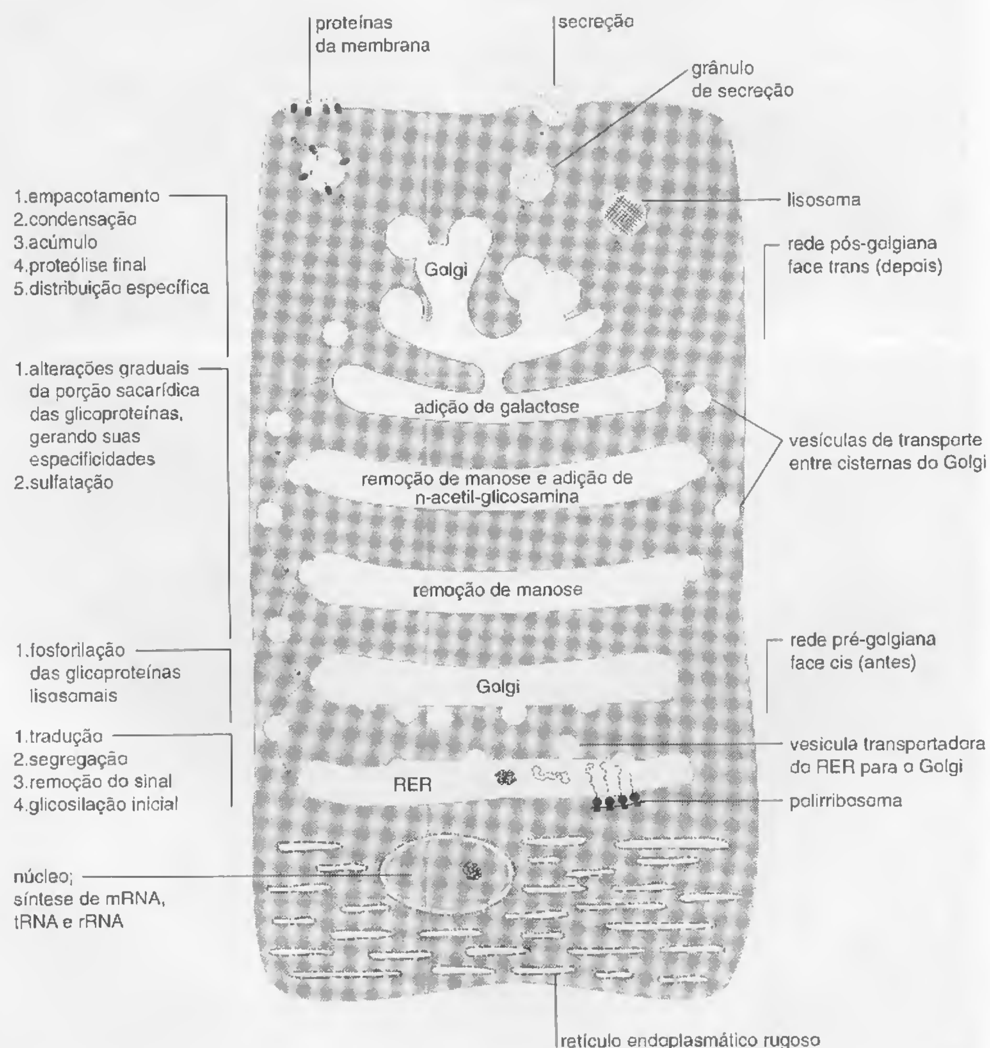


Fig. 10.12 Esquema apresentando, no lado direito, os vários compartimentos celulares que participam da secreção. À esquerda, os processos moleculares e funcionais ocorrendo nos respectivos compartimentos. A síntese das glicoproteínas começa no retículo endoplasmático rugoso, de onde elas são transportadas por vesículas para a rede pré-golgiana e, sucessivamente, para os vários compartimentos, até atingirem o ápice da célula (no exemplo, uma célula pancreática, como a da Fig. 10.24). Observe que a marcação das enzimas lisosômicas começa precocemente, por fosforilação, na rede pré-golgiana. As glicoproteínas gradualmente vão se transformando, por remoções e adições na porção glicídica, gerando-se glicoproteínas específicas. Na rede pós-golgiana (trans), as glicoproteínas se associam a diferentes tipos de receptores específicos, sendo então levadas aos locais a que se destinam. À esquerda do desenho está indicado um fluxo invertido de vesículas, que retorna da membrana ao retículo endoplasmático e pode também devolver moléculas próprias dele que tenham sido, erradamente, levadas para o aparelho de Golgi. Observe que o processo, inicialmente inespecífico, torna-se específico no seu final, dirigindo as moléculas para três destinos: membrana plasmática, secreção e lisosomas.

A face convexa do Golgi é chamada **face cis**, em contraposição à face oposta, côncava, de onde se originam vesículas grandes contendo material processado, e que recebeu o nome de **face trans** (Fig. 10.11). Na face cis, as cisternas do Golgi formam a **rede pré-golgiana** e, na face trans, formam a **rede pós-golgiana** (Fig. 10.12). As cisternas localizadas entre essas duas redes são, muitas vezes, chamadas **cisternas médias**.

Uma análise mais atenta desta organela mostra a presença de numerosas vesículas esféricas, com aproximadamente 60 nm de diâmetro, que transportam material do retículo endoplasmático para o Golgi, de uma cisterna do Golgi para outra e, também, do Golgi para outras organelas. Por suas funções, são denominadas **vesículas transportadoras**.

As membranas do aparelho de Golgi, como as demais membranas celulares, são constituídas de fosfolipídios e proteínas. Muitas dessas proteínas são enzimas relacionadas com a síntese de glicoproteínas (glicosiltransferases), sulfatação (sulfotransferases) e fosforilações (fosfotransferases). É também no aparelho de Golgi que ocorre a síntese da porção glicídica das proteoglicanas, compostos presentes na superfície celular e que são, também, componentes importantes da matriz extracelular.

Há indícios de que várias macromoléculas sofrem desidratação dentro dos grânulos de secreção que se formam no aparelho de Golgi, o que explica a presença de grânulos maiores e menos elétron-densos (mais claros) ao lado de grânulos menores e mais densos. A esses grânulos de secreção pouco densos aos elétrons, deu-se o nome **grânulos imaturos**, em contraposição aos **grânulos maduros**, mais densos aos elétrons.

Esse aumento de densidade aos elétrons ocorre devido a um processo de desidratação e diminuição do tamanho dos grânulos. O processo traz economia de espaço para a célula, permitindo o acúmulo de maior quantidade de macromoléculas em menor volume. Além dos grânulos de secreção, os grânulos dos leucócitos granulócitos e os lisosomas também são formados no aparelho de Golgi.

As proteínas sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso passam, no próprio retículo e no aparelho de Golgi, por transformações pós-traducionais que são de importância na biologia e patologia celulares

As alterações pós-traducionais modificam profundamente as características funcionais das moléculas protéicas, contribuindo muito para gerar a variedade de proteínas existentes nas células. Nas cisternas do RER, as cadeias polipeptídicas sintetizadas nos polirribosomas interagem e vão gerar as estruturas secundárias, terciárias e quaternárias das proteínas. Além dessas modificações que influem na sua forma tridimensional, as moléculas protéicas podem passar por processos de proteólise limitada, gerando fragmentos biologicamente ativos, como ilustrado nas Figs. 10.13 e 10.14. Outra modificação importante, nas moléculas protéicas, é a adição de radicais diversos, como hidroxila, sulfato e fosfato.

A maioria das glicoproteínas sofre uma **glicosilação inicial** nas cisternas do retículo endoplasmático rugoso. Essa glicosilação é a mesma para todas as glicoproteínas, e este produto é, então, transferido para o Golgi via vesículas transportadoras que brotam do retículo, deslocam-se para a face convexa (cis) e aí se fundem com as cisternas da rede pré-golgiana. Nas cisternas do Golgi, ocorrem a hidrólise parcial da fração glicídica das glicoproteínas e a adição de novos açúcares, cuja composição varia com o tipo de glicoproteína que está sendo sintetizada. Esse processo, chamado de **glicosilação terminal**, resulta na síntese de glicoproteínas diferentes que terão composição e destino diversos, conforme o tipo de glicosilação que sofreram. A glicosilação terminal é responsável não só por parte da especificidade dos vários tipos de glicoproteínas, mas também pelo destino final desses compostos. Funciona, assim, como se fosse o endereço colocado no envelope de uma carta.

Verificou-se, também, que as várias enzimas glicosilantes (glicosiltransferases) não estão homogeneamente distribuídas na seqüência das cisternas do Golgi, mas que cada cisterna contém especificamente segregada uma ou mais dessas enzimas. Como seria previsível, a presença e distribuição de determinadas glicosiltransferases nas cisternas do Golgi é variável de acordo com a atividade específica de cada tipo celular. Outra atividade sintética importante que tem lugar nas cisternas do aparelho de Golgi é a adição de radicais sulfato (sulfatação) à fração glicídica de glicoproteínas e proteoglicanas.

A complexidade dos processos de síntese das glicoproteínas resulta na alta diversidade das moléculas desses compostos, o que explica a diversidade funcional das glicoproteínas (Tabela 10.1).

Além desse processo de glicosilação específica dependente dos açúcares a elas adicionados, determinadas glicoproteínas são marcadas graças à fosforilação de sua fração glicídica. É o que ocorre com as enzimas lisosômicas. As proteínas (enzimas) destinadas ao interior dos lisosomas são sintetizadas no RER e transferidas para o aparelho de Golgi por meio das vesículas transportadoras, junto com as proteínas que serão secretadas e outras proteínas que seguem essa mesma via (RER → Golgi), porém têm destinos diferentes. No aparelho de Golgi, as proteínas destinadas aos lisosomas são marcadas pela adição de radicais fosfato aos resíduos de manose. Estas proteínas fosforiladas na manose interagem com receptores para manose-6-fosfato, localizados na face interna das membranas do aparelho de Golgi e, assim, são separadas da via secretória e dirigidas para os lisosomas que brotam do aparelho de Golgi (Fig. 10.15).

Foi descoberta uma doença humana (doença de células I, *Inclusion Cell Disease*) causada por deficiência numa fosfotransferase que participa da fosforilação da manose. A não-fosforilação dos resíduos de manose das enzimas lisosômicas determina que estas enzimas entrem na via secretória e sejam eliminadas da célula. Os lisosomas de certas células ficam deficientes em enzimas, e essas células se carregam de inclusões citoplasmáticas, constituídas de moléculas não-digeridas. O fato de que, nessa doença, certas células tenham lisosomas normais, com enzimas, faz supor que existe outro mecanismo para dirigir as enzimas para os lisosomas, além da fosforilação da manose, já mencionada. Clinicamente, a doença de células I caracteriza-se por retardo do crescimento, alterações ósseas e infecções freqüentes.

Finalmente, em alguns tipos celulares, é nas cisternas do Golgi que se inicia um processo de proteólise que cinde determinadas partes de uma proteína, transformando uma **proproteína** em uma proteína ativa. Este processo continua e se completa nos grânulos de secreção. Um caso bem estudado desta atividade é a transformação de pró-insulina em insulina, nas células β das ilhotas do pâncreas, mas este processo ocorre com muitas outras proteínas.

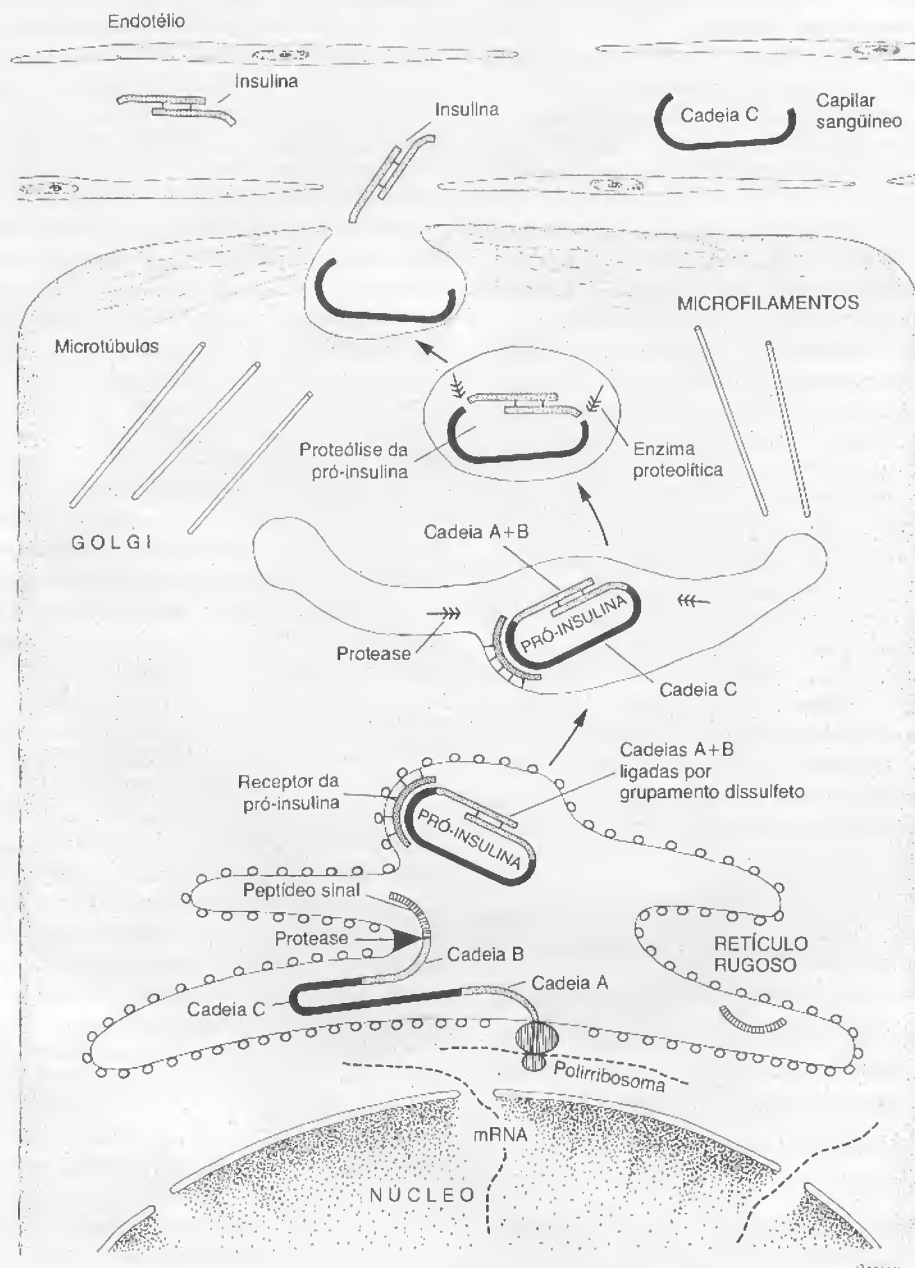


Fig. 10.13 Desenho esquemático mostrando as modificações pós-traducionais de uma proteína que é secretada. No caso, a insulina foi escolhida como exemplo. No retículo rugoso se processa a síntese da pró-insulina contendo o peptídeo sinal (com as cadeias A, B e C). Nas cisternas do retículo ocorre a perda da seqüência sinal, por proteólise limitada, bem como o dobramento da molécula para formar a pró-insulina, com sua estrutura terciária. A proteólise da pró-insulina se processa nos grânulos de secreção, onde a pró-insulina perde a cadeia polipeptídica C, formando assim a insulina. Esse hormônio é concentrado nos grânulos de secreção, que migram para o ápice das células com a participação de proteínas motoras, apoiadas nos microtúbulos. Em seguida, a insulina é secretada para o meio extracelular, por exocitose.

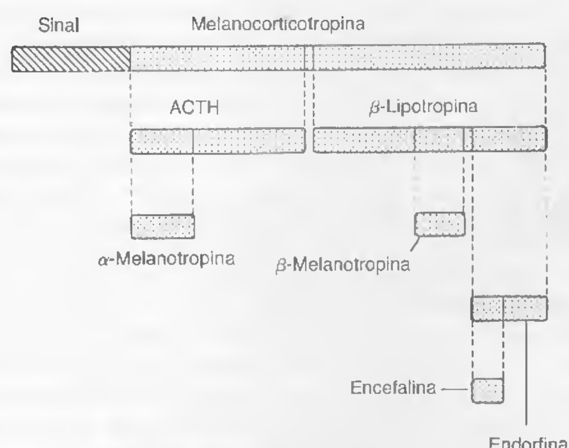


Fig. 10.14 Desenho esquemático exemplificando a seqüência de proteólises limitadas de uma molécula protéica muito grande, que origina diversas proteínas menores com atividade hormonal. Trata-se de alteração pós-traducional redundando em aumento do número de proteínas com funções específicas. Os traços pontilhados indicam os locais de ação da protease.

Tabela 10.1 Exemplos de funções assumidas pelas glicoproteínas, ilustrando a diversidade funcional dessas macromoléculas

FUNÇÃO	EXEMPLOS
ESTRUTURAL	Na célula: membrana celular. Extracelular: parede da célula vegetal, colágeno, elastina, fibrina, matriz extracelular.
MOLÉCULAS DE TRANSPORTE PARA:	Vitaminas, lipídios (incluindo hormônios esteróides) e minerais.
IMUNOLÓGICA	Anticorpos, moléculas do complemento, intérferon, antígenos de histocompatibilidade.
PROTEÇÃO E LUBRIFICAÇÃO	Muco.
HORMONAL	Gonadotrofinas e hormônio tireotrófico (TSH).
ADESÃO ÀS CÉLULAS E RECEPTORES	Adesão de célula a célula, de célula a vírus, de microrganismo a célula. Receptores hormonais.
ENZIMAS	Proteases, glicosidases, nucleases.

A multiplicidade de eventos pós-traducionais, já mencionados, na formação de proteínas tem a vantagem de levar a uma diversidade estrutural e funcional das moléculas protéicas traduzidas de um mesmo mRNA. Esse processo, relativamente freqüente, tem porém o seu preço, pois, aumentando o número de enzimas envolvidas, aumenta também a incidência de doenças relacionadas com as proteínas em questão, devido à falência de uma das enzimas envolvidas no processo. O caso da proteína colágeno presente nos ossos, pele, tendões, ligamentos etc. é típico, pois se trata de uma família de proteínas que é altamente diversificada, não só devido ao fato de ser codificada por vários genes, mas também porque passa por diversas modificações pós-traducionais, como hidroxilações, glicosilações, proteólises limitadas, formação de estrutura terciária variável etc. Como exemplos ilustrativos da patologia do colágeno, podem ser citadas as síndromes de Ehlers-Danlos, onde é freqüente a presença de pele friável, amolecimento dos ligamentos das articulações (contorcionistas de circo) e lesão de colágeno do olho, vasos e tubo digestivo.

Outra doença conseqüente a defeito pós-traducional, que pode ser citada como exemplo, é um tipo de diabete que é devido à

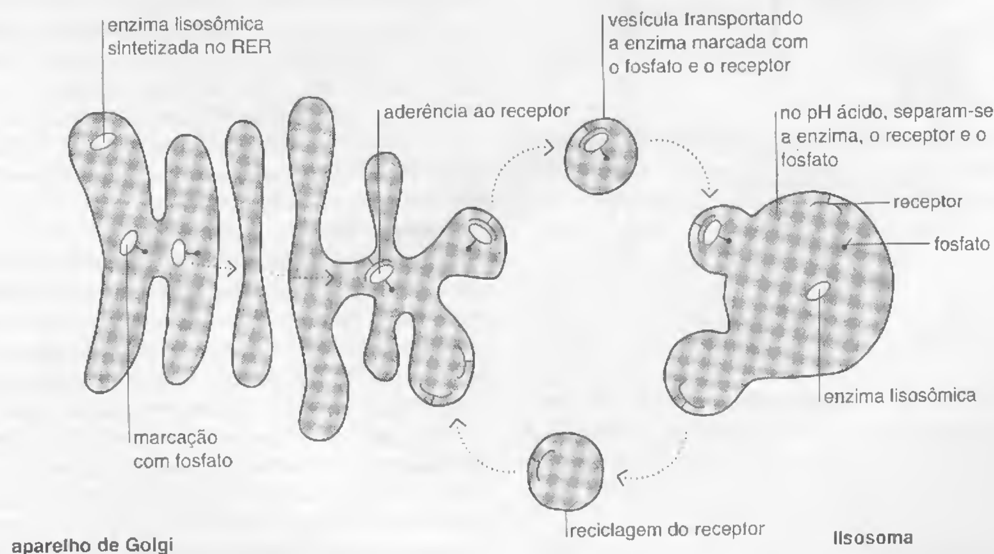


Fig. 10.15 Esquema ilustrando o processo de marcação das glicoproteínas lisosômicas pela sua fosforilação na rede pré-golgiana (cis); acoplamento a receptores na rede pós-golgiana (trans); transporte vesicular aos lisosomas; ativação das enzimas lisosômicas; e reciclagem dos receptores.

não-transformação da pró-insulina (inativa) em insulina ativa, em conseqüência de uma falha no processo de proteólise que ocorre nos grânulos de secreção das células β das ilhotas de Langerhans.

Existem células que sintetizam glicoproteínas com alto teor de hidrato de carbono (células mucosas)

Como já foi visto, existe uma grande diversidade de glicoproteínas. A maioria delas tem uma porção polissacarídica relativamente longa ligada a uma molécula protéica. Existe porém uma classe de glicoproteínas que contém um teor de polissacarídeos particularmente elevado. Conseqüentemente, são moléculas altamente hidrófilas e viscosas, cuja função principal é a lubrificação e defesa. Elas são produzidas por células localizadas no tubo digestivo e na árvore respiratória, chamadas coletivamente de **células mucosas**. Estas células apresentam o núcleo deslocado para a base e o ápice celular é dilatado e cheio de grânulos de secreção, grandes e pouco densos aos elétrons. A ultra-estrutura destas células revela que elas contêm um pequeno acúmulo de RER na sua base (que produz a fração protéica) e um Golgi supranuclear muito desenvolvido (Figs. 10.16 e 10.17), local onde é adicionado o alto teor de polissacarídeos característico das glicoproteínas produzidas nestas células. Algumas destas glicoproteínas contêm sulfato na sua molécula graças ao processo de sulfatação que também ocorre no Golgi. A célula mais estudada deste grupo é a célula mucosa do intestino, que, devido à forma de taça, é conhecida como **célula caliciforme**.

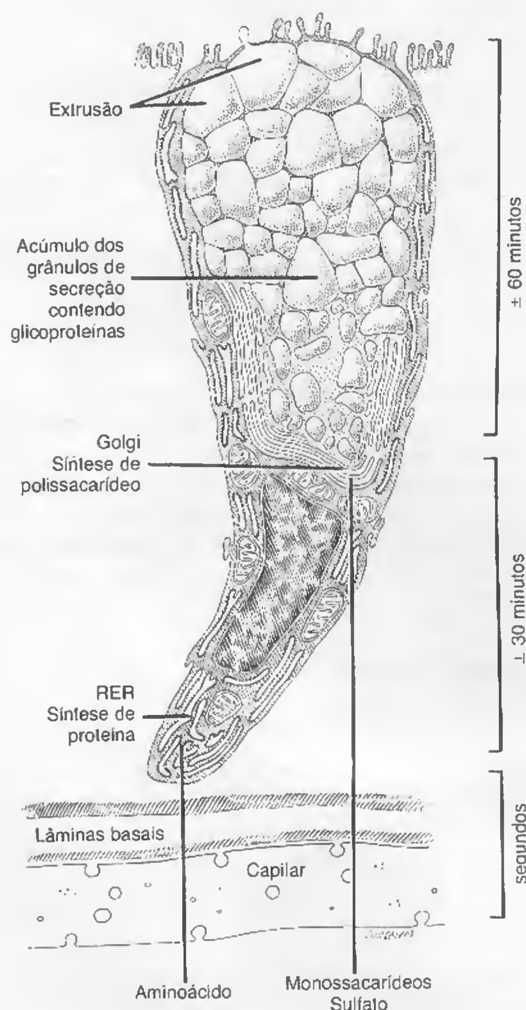


Fig. 10.16 Esquema ilustrando a morfologia e o funcionamento da célula mucosa do intestino, chamada caliciforme. Observar a forma estreitada na parte basal, onde seu citoplasma apresenta retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias. É no retículo que ocorre a síntese da porção protéica das glicoproteínas à custa de energia produzida nas mitocôndrias. Na região acima do núcleo, nota-se o aparelho de Golgi desenvolvido, principal local da síntese da fração glicídica da glicoproteína. Ao lado direito da figura, uma escala de tempo indicando a duração do processo de síntese. (Baseado em estudos de Neutra, M. e Leblond C.P.)

O retículo endoplasmático liso exerce funções muito diversificadas

O retículo endoplasmático liso apresenta-se como formações tubulosas que se anastomosam profusamente (Fig. 10.18). Das suas inúmeras funções, a principal, provavelmente, é a sua participação nos processos de metabolização e desintoxicação de vários compostos.

Sabe-se que o organismo tem a capacidade de transformar vários compostos que lhe são nocivos ou de difícil excreção em substâncias inócuas ou, então, facilmente elimináveis. As células do fígado, principalmente, têm esta capacidade. O estudo do efeito da ingestão de barbitúricos revelou que estas drogas promovem acentuado aumento do retículo endoplasmático liso das células hepáticas. Essa observação morfológica foi comprovada por análise bioquímica, que demonstrou haver aumento da atividade das enzimas que metabolizam os barbitúricos e outros compostos tóxicos, e também que esta atividade está localizada nas membranas do retículo endoplasmático liso. O aumento do retículo endoplasmático liso por ação de drogas contribui para a redução do efeito de determinados medicamentos após certo tempo de uso. Nesses casos, ocorre um aumento tal na atividade do sistema de desintoxicação que há necessidade de doses maiores para promover o mesmo efeito que, no início, era obtido com doses pequenas, pois uma parte considerável da droga é destruída no fígado.

É também no retículo endoplasmático liso das células do fígado que é solubilizado o pigmento da bile (bilirrubina) devido à ação da enzima **glicuroniltransferase**, permitindo que a bilirrubina, na sua forma solúvel, seja secretada pelas células hepáticas, sendo eliminada do fígado pela bile. Quando existe deficiência de glicuroniltransferase, os pacientes acumulam bilirrubina insolúvel no sangue e ficam ictéricos (doença de Crigler-Najjar). Baseado na observação citada, de que os barbitúricos estimulam a síntese das enzimas do retículo endoplasmático liso, a administração de barbitúricos é usada no tratamento desse tipo de icterícia.

O retículo endoplasmático liso é o principal reservatório de Ca^{2+} do citoplasma. A concentração desse íon no citosol é muito baixa, sendo porém aumentada para ativar certos processos celulares, em resposta ao estímulo trazido por sinais químicos. O aumento, nestes casos, se deve à abertura de canais específicos para passagem de Ca^{2+}, presentes na membrana do retículo endoplasmático liso. Cessado os efeitos da mensagem química recebida, os íons Ca^{2+} retornam à cisterna do retículo endoplasmático liso. Por exemplo,

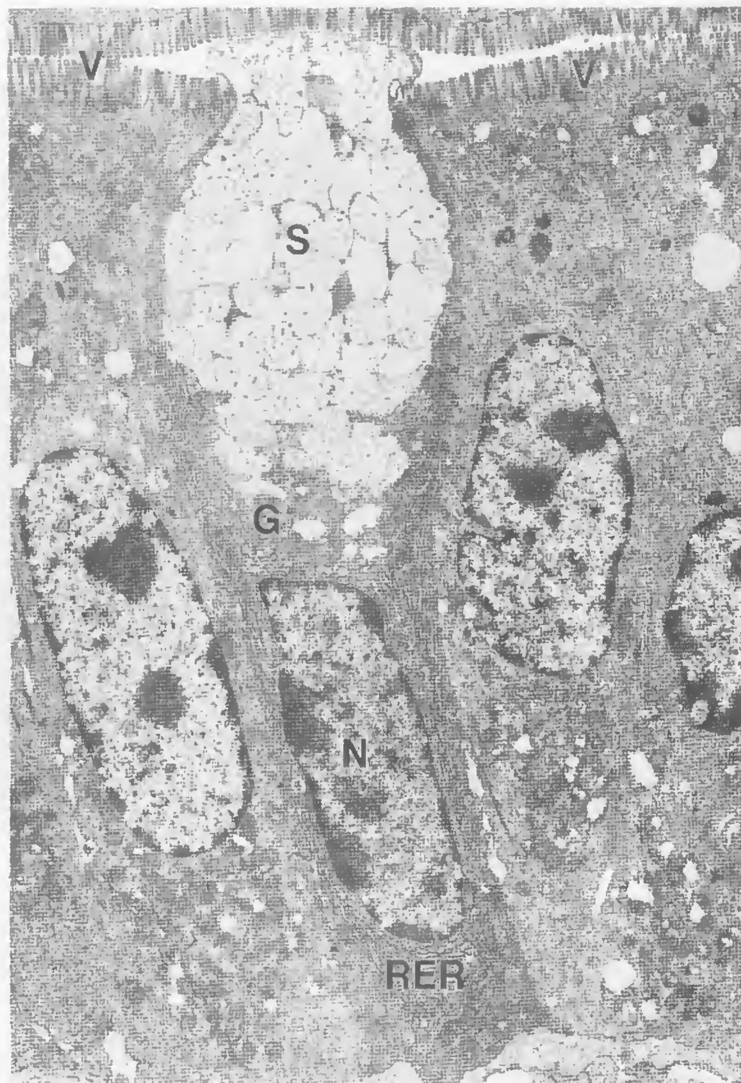


Fig. 10.17 Eletromicrografia de células de intestino delgado. Observa-se uma célula caliciforme típica que secreta glicoproteínas. O núcleo **(N)** apresenta-se na base da célula, região rica em retículo endoplasmático rugoso **(RER)**. Logo acima do núcleo, o aparelho de Golgi **(G)**. A maior parte da célula é ocupada por grandes grânulos de secreção **(S)** pouco elétron-densos. Trata-se de uma célula que sintetiza, segrega, acumula e exporta complexos de proteínas e polissacarídeos. Lateralmente, células do intestino, especializadas na absorção de nutrientes, com microvilos na superfície **(V)**. 7.500 ×.

quando as células musculares estriadas são estimuladas pelos neurotransmissores liberados nas placas motoras, o Ca^{2+} sai do retículo pelos canais de cálcio e promove a contração das miofibrilas, levando à contração da célula muscular inteira. Cessando o estímulo, os íons Ca^{2+} são trazidos de volta às cisternas do retículo liso por processo ativo, isto é, que consome energia.

Outra função do retículo endoplasmático liso é a síntese de fosfolipídios para as numerosas membranas celulares. Alguns dos lipídios das membranas são inicialmente produzidos no retículo liso e suas moléculas são completadas no aparelho de Golgi. Isto acontece com a esfingomielina e com os glicolipídios, cujas partes glicídicas são produzidas com a colaboração do aparelho de Golgi. As enzimas que sintetizam fosfolipídios são proteínas integrais da membrana do retículo liso, com suas partes ativas fazendo saliências na face citoplasmática do retículo. Assim, as novas moléculas de fosfolipídios são inseridas no folheto citosólico da membrana, e, depois, algumas são transferidas para o folheto interno (lado da cisterna) com o auxílio de proteínas denominadas flipases.

Do retículo liso, as moléculas de fosfolipídios são distribuídas, principalmente por meio de vesículas transportadoras, para as demais membranas celulares. À medida que as membranas são transferidas de compartimento celular, vão sofrendo modificações, o que se depreende pelo fato de que as membranas das diversas organelas são diferentes. As modificações desses lipídios são devidas a vários fatores. 1. A maioria das organelas são capazes de modificar moléculas lipídicas, por exemplo, convertendo moléculas de fosfatidilserina em fosfatidilcolina. 2. Quando as vesículas se destacam de um compartimento para outro, elas carregam preferencialmente certas moléculas lipídicas, deixando para trás outras, que se tornam proporcionalmente mais numerosas na membrana de onde se originou a vesícula. 3. O citosol possui proteínas transportadoras de fosfolipídios, que transferem certos fosfolipídios de uma membrana para outra, através do citosol, que é um meio hidrofílico. Essas proteínas transportadoras envolvem a parte hidrofóbica da molécula de fosfolipídio, possibilitando sua passagem pelo citosol (Fig. 10.19).

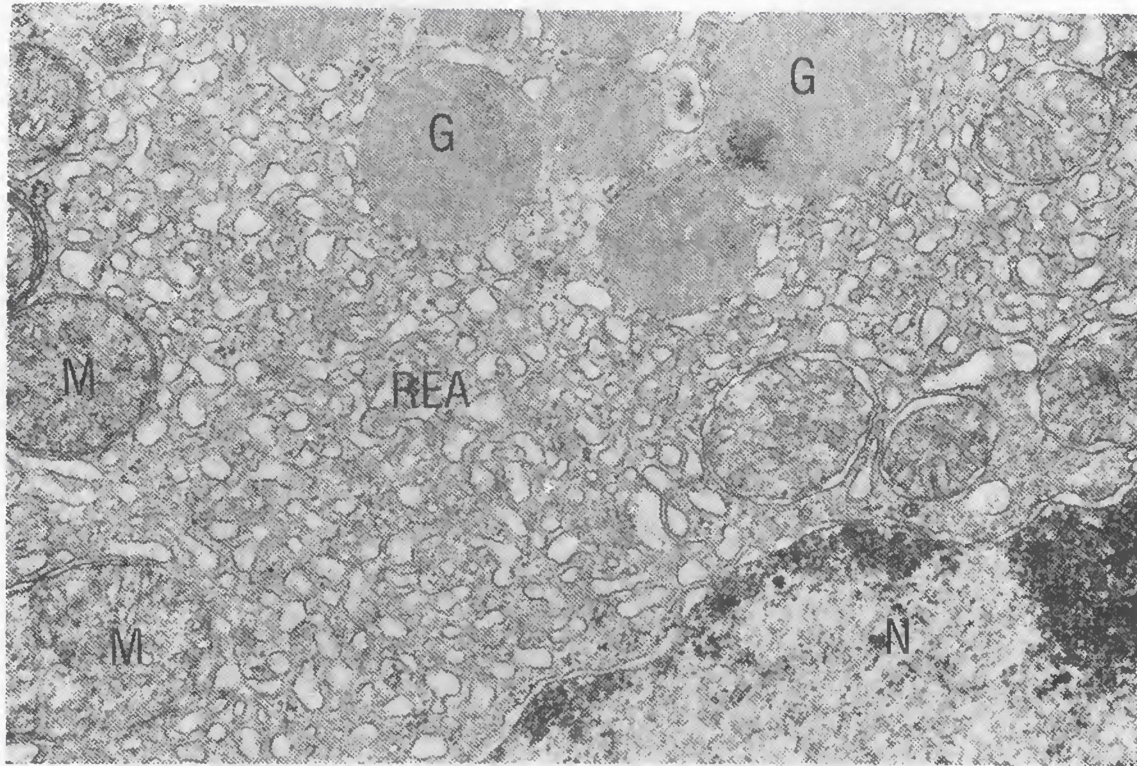


Fig. 10.18 Eletromicrografia de corte de célula intersticial do testículo mostrando o retículo endoplasmático liso **(REA)** formado por túbulos que se anastomosam. Em **N** núcleo, **M** mitocôndria, **G** gotículas lipídicas. 40.000 ×.

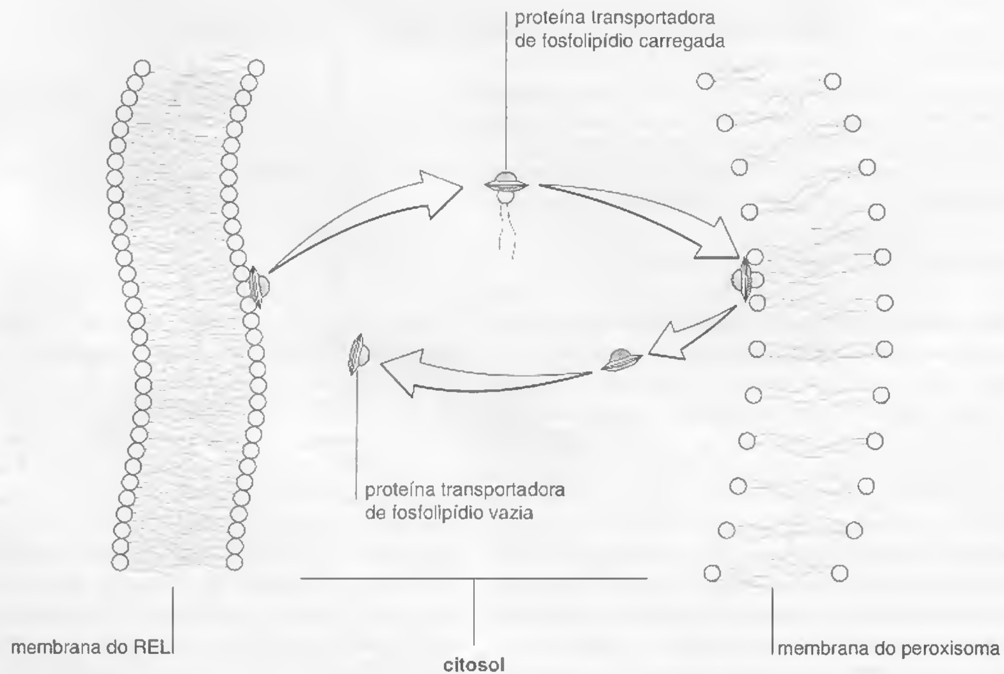


Fig. 10.19 Os fosfolipídios para as diversas membranas que separam os compartimentos intracelulares são sintetizados no retículo endoplasmático liso. A transferência desses fosfolipídios para outras membranas pode ocorrer via vesículas transportadoras. Mas, em certos casos, como na transferência para os peroxisomas, as moléculas de fosfolipídio atravessam o citosol carregadas por proteínas transportadoras especiais. Essas proteínas transportadoras têm regiões lipossolúveis e regiões hidrossolúveis e, assim, levam os fosfolipídios através do citosol, que é um meio aquoso. O transporte é feito de uma membrana rica em fosfolipídios (REL) para a membrana do peroxisoma, pobre em fosfolipídios.

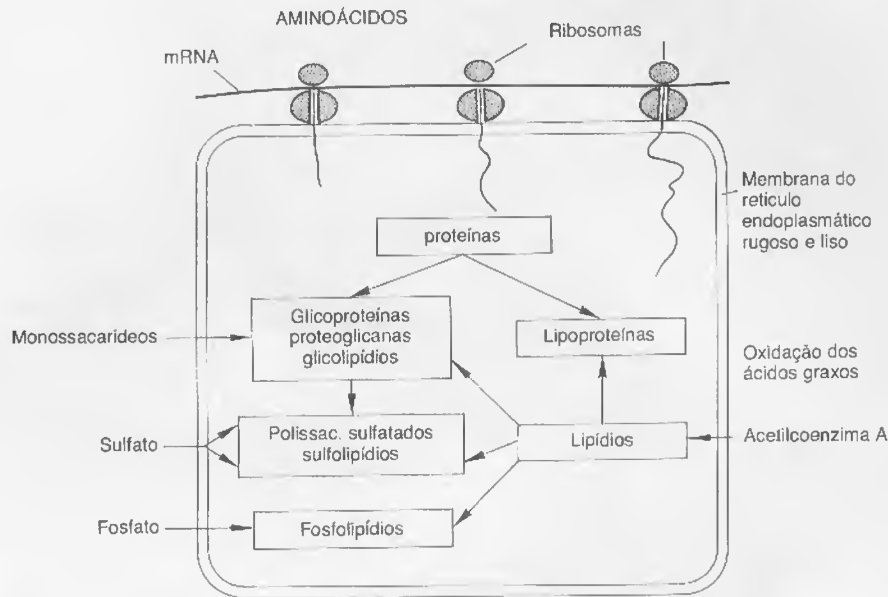


Fig. 10.20 Esquema ilustrando o papel central exercido pelo retículo endoplasmático na síntese de várias macromoléculas de importância biológica.

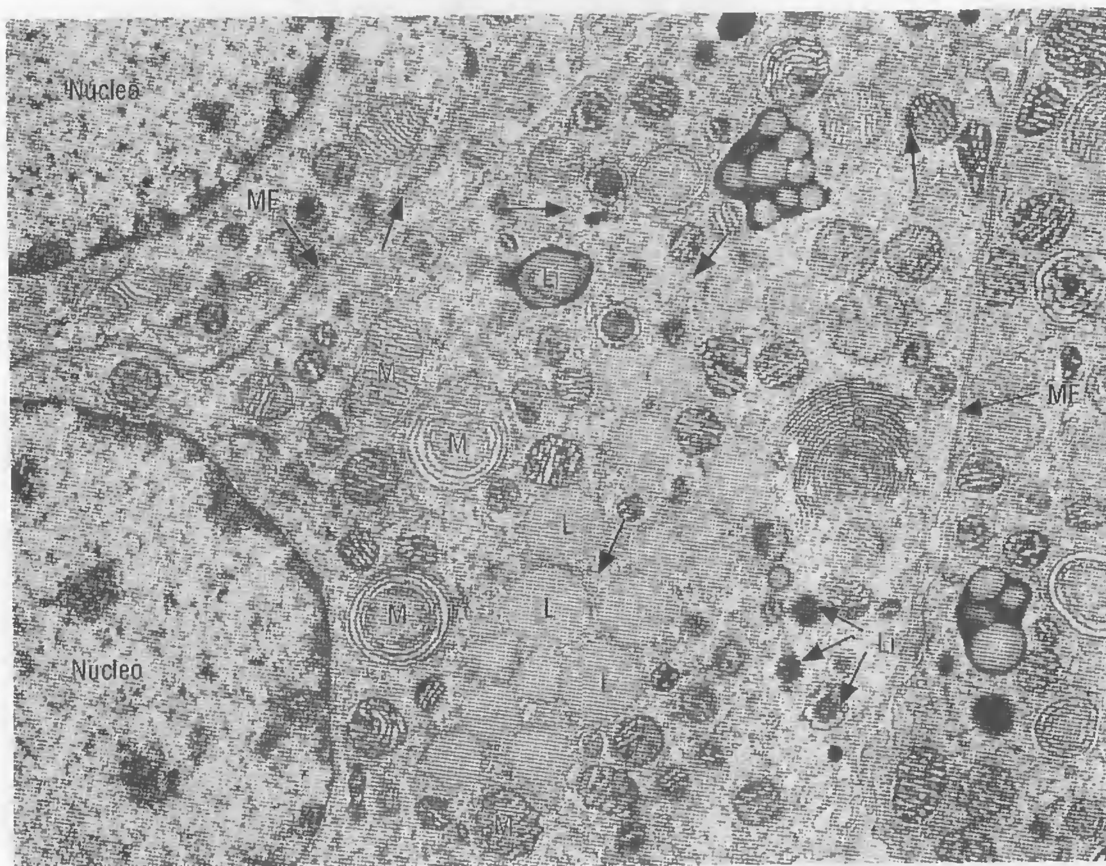


Fig. 10.21 Eletromicrografia de células da região cortical da glândula adrenal de camundongo. À esquerda, dois núcleos. Notar o acúmulo de gotículas de lipídios **(L)**, mitocôndrias **(M)** e lisosomas **(Li)**. Entre as organelas, o retículo endoplasmático liso **(setas)**. O aparelho de Golgi **(G)** nesta célula é formado por muitos sacos achatados que se dispõem em semicírculo. Em **ME**, as membranas que limitam as duas células. 14.100 ×.



Fig. 10.22 Eletromicrografia de células do corpo lúteo de ovário produtoras de esteróides. À direita, núcleo celular. Observe a abundância de retículo endoplasmático liso **(REL)** característico de célula que produz esteróides. As formações escuras são mitocôndrias **(M)**. Em **G**, gotículas de lipídios. À esquerda, o limite entre duas células, onde se vêem as duas membranas plasmáticas dispostas paralelamente. Do lado direito das membranas, microtúbulos cortados longitudinalmente **(setas)**. 70.000 ×.

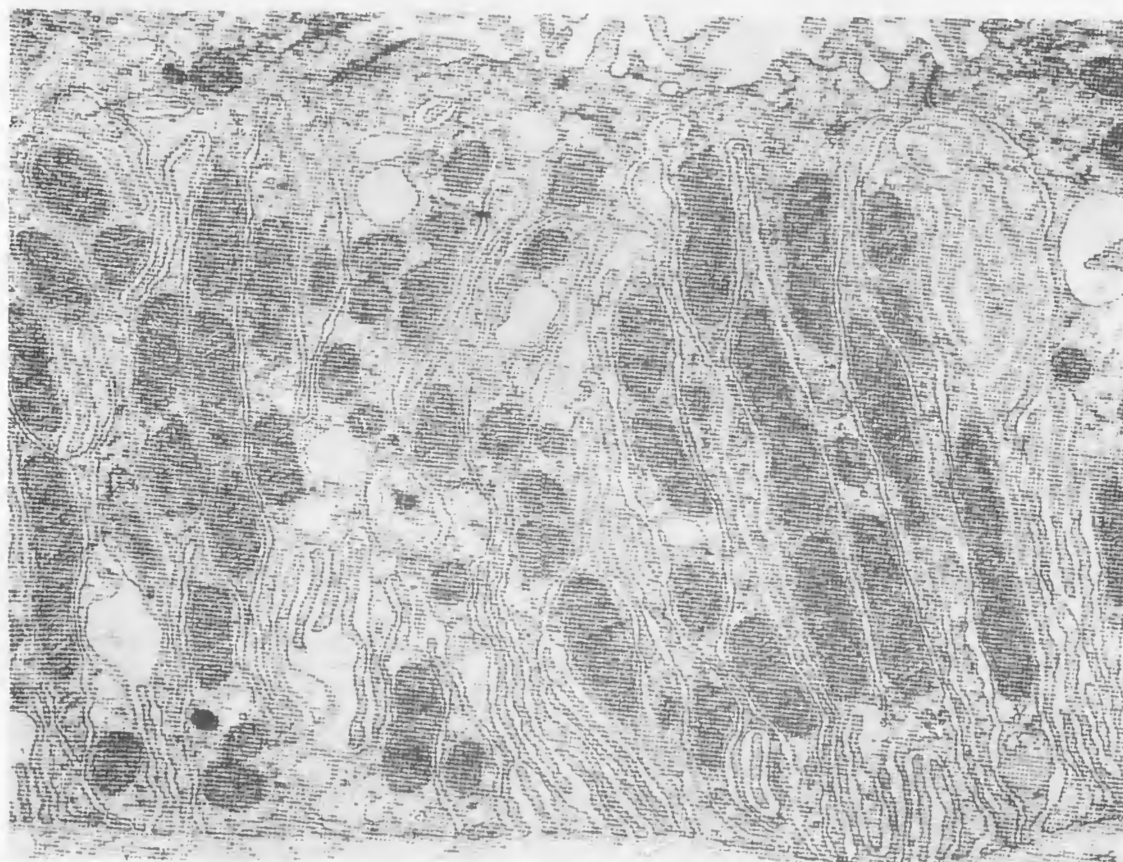


Fig. 10.23 Eletromicrografia de célula de túbulo do rim. Trata-se de uma célula especializada no transporte de íons. O núcleo não aparece neste corte. Embaixo, a região basal da célula; em cima, a região apical. Observe as duas características básicas da célula que transporta íons, que são: invaginações da membrana e acúmulo de mitocôndrias dispostas em paliçada. 16.000 ×.

Nas células epiteliais absortivas do intestino delgado, o retículo endoplasmático liso é responsável pela síntese dos triglicerídeos, a partir dos ácidos graxos e glicerol absorvidos por essas células dos nutrientes presentes na luz do intestino delgado. Em seguida, as moléculas de triglicerídeos sintetizadas no REL são transferidas para o meio extracelular do tecido conjuntivo subjacente às células epiteliais e, daí, carregadas pelo sangue e pela linfa para serem distribuídas pelo organismo.

Em várias regiões da célula, o retículo endoplasmático liso se comunica com o rugoso. Há dados, no entanto, que indicam terem as membranas destes dois tipos de retículo constituição química e atividades biológicas diferentes, tratando-se, portanto, de estruturas distintas. Pelo exposto, percebe-se que tanto o retículo endoplasmático liso como o rugoso têm papel de extrema importância na economia celular, desempenhando funções altamente diversificadas. O retículo endoplasmático (liso e rugoso) é a sede principal da síntese celular, convergindo nele os processos sintéticos da maioria das macromoléculas de importância biológica. Este aspecto é ilustrado na Fig. 10.20.

Os hormônios esteróides são sintetizados graças à proximidade e interação do retículo endoplasmático liso com as mitocôndrias

A análise bioquímica das mitocôndrias e do retículo liso, isolados por centrifugação fracionada de células que sintetizam esteróides, demonstrou que as enzimas envolvidas na síntese desses compostos se encontram distribuídas nessas duas estruturas. Essa situação explica a abundância desses dois componentes celulares e sua proximidade nas células que sintetizam esteróides.

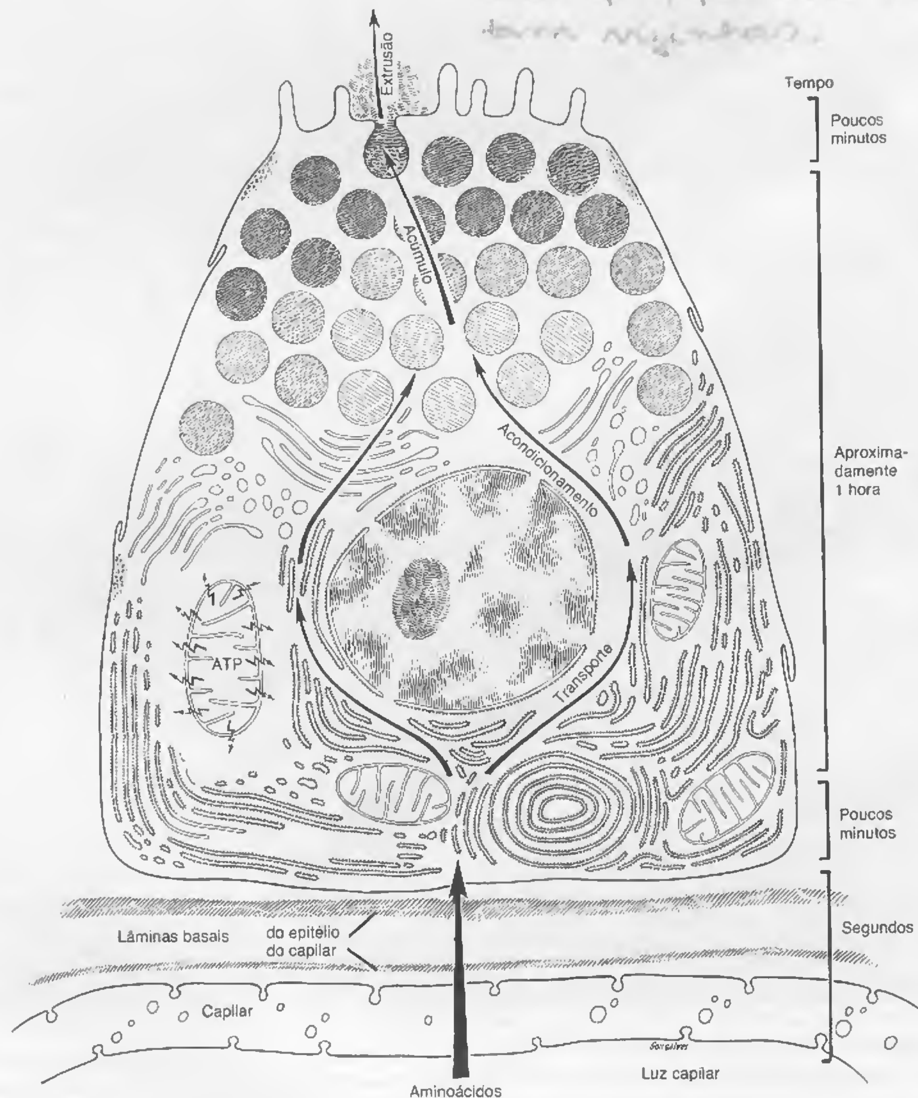


Fig. 10.24 Desenho esquemático de uma célula glandular serosa, no caso uma célula acinosa do pâncreas. Observe-se a nítida polaridade da célula com abundante retículo rugoso e mitocôndrias na região basal. No pólo apical, encontram-se o aparelho de Golgi e grânulos de secreção. O processo de secreção está descrito no texto. Ao lado direito da figura, uma escala de tempo indicando a duração dos processos.



Fig. 10.25 Eletromicrografia de células do oviduto de sapo. Esta figura ilustra uma célula que sintetiza, segrega, acumula e exporta proteínas. O núcleo está na base da célula, região rica em retículo endoplasmático rugoso **(REG)**, e apresenta um nucléolo **(Nu)** evidente. O pólo apical é cheio de grânulos de secreção. Os grânulos indicados por **I** são imaturos, pouco densos aos elétrons e estão se condensando para formar os grãos maduros **(M)**, mais elétron-densos. 10.000 ×.

des (Figs. 10.21 e 10.22). Estas células ilustram bem a estreita colaboração metabólica entre duas organelas que, por esse motivo, se apresentam vizinhas.

A secreção celular pode ser apenas um transporte ativo, mas, na maioria dos casos, envolve a síntese de moléculas

A expressão **secreção celular** tem sido usada com significados diferentes. De modo geral, e no seu sentido mais amplo, subentende a atividade pela qual a célula retira do líquido extracelular um produto cuja composição difere, qualitativa e quantitativamente, da composição do plasma sangüíneo.

Dentro deste conceito amplo, a produção de suor deve ser considerada uma secreção. De fato, neste caso, a água e certas substâncias nocivas ao organismo, como, por exemplo, os excessos de uréia e de íons K^{-}, são retirados do sangue e eliminados pelo suor. Nas chamadas glândulas do sal de aves e répteis marinhos, o transporte de cloreto de sódio ocorre para a luz da glândula e daí para o exterior do organismo, eliminando, assim, o excesso de cloreto e sódio.

Nos casos referidos, a secreção se reduz a um transporte seletivo, através da célula, de material presente no sangue. Na maioria dos casos de secreção, porém, o processo é mais complexo e caracteriza-se pela síntese e acúmulo intracelular de macromoléculas. São exemplos desse tipo de atividade as células digestivas (elaboram proteínas enzimáticas), as células caliciformes do intestino que elaboram glicoproteínas (complexos de polissacarídeos e proteínas) e as células do córtex da glândula adrenal, que sintetizam hormônios esteróides. Em geral, a capacidade de transporte seletivo ocorre simultaneamente à de elaboração de macromoléculas. As células do pâncreas, por exemplo, transportam íons, além de sintetizarem enzimas digestivas. A especialização para o transporte de íons está, em geral, associada à presença, na célula, de duas características morfológicas. Uma delas é a presença de mitocôndrias longas, dispostas em paliçada na base da célula; a outra é a presença de abundantes invaginações da membrana plasmática da região basal da célula (Fig. 10.23). Via de regra, quanto mais intensa a atividade de transporte de íons, mais acentuadas são essas duas características.

Considere-se, agora, aquelas células onde predominam os fenômenos de síntese e armazenamento, sobre os de transporte, como acontece, por exemplo, nas células do pâncreas exócrino. Esse tipo celular produz proteínas nos polirribosomas do retículo endoplasmático rugoso, e as cadeias peptídicas são injetadas dentro das cisternas do retículo. Esse processo, extremamente rápido, é facilitado pelo transporte ativo de aminoácidos na membrana da parte basal das células. Após a sua síntese e segregação, as proteínas ficam visíveis sob a forma de um material granuloso dentro do retículo (Fig. 10.4). Na etapa seguinte são transferidas, pelas vesículas de transporte, para o interior das cisternas da rede pré-golgiana e, daí, para as cisternas do aparelho de Golgi. Em seguida, as proteínas são concentradas em vesículas de tamanho bem maior, que se destacam lateralmente do aparelho de Golgi para formar as vesículas ou grânulos de secreção. Esses grânulos ficam acumulados no ápice das células, até que o organismo necessite do seu produto (Fig. 10.24). Devido a estímulo nervoso ou hormonal, a célula promove a extrusão dos grânulos. Substâncias que despolimerizam microtúbulos prejudicam o processo de exocitose em vários tipos celulares, o que mostra que essas estruturas participam da extrusão dos grânulos de secreção.

A Fig. 10.25 ilustra a ultra-estrutura de uma célula glandular que, neste caso, sintetiza, acumula e secreta a glicoproteína formadora da gelatina que envolve o ovo dos anfíbios.

O transporte de íons parece consumir mais energia do que a síntese de macromoléculas

A energia necessária para a secreção é fornecida principalmente através do processo de oxidação fosforilativa, e o ATP é o depósito da energia consumida no processo. Do ponto de vista do consumo de energia, tudo indica que o transporte de íons seja um processo muito mais dispendioso do que a síntese de macromoléculas. Isto explica por que as células cuja atividade é sobretudo de transporte consomem mais oxigênio e têm mais mitocôndrias do que as células cuja principal atividade é a de síntese. Na célula pancreática, durante o processo de secreção, a energia é gasta no transporte das proteínas para o complexo de Golgi e, daí, para os grânulos e, finalmente, na extrusão dos grânulos. Todos esses processos são deprimidos por drogas inibidoras da fosforilação oxidativa, sendo relativamente insensíveis a inibidores da glicólise.

Sumário

A maioria das macromoléculas celulares sofre um processo constante de degradação e renovação. A síntese destas moléculas é feita a partir dos precursores obtidos dos alimentos. As organelas celulares mais diretamente envolvidas nos processos de síntese são o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi. O polirribosoma pode estar livre no citoplasma ou preso à membrana do retículo endoplasmático.

O retículo endoplasmático é um sistema de cisternas intercomunicantes, delimitadas por membrana, constituído de vesículas achatadas, esféricas ou tubulares.

Uma parte do retículo endoplasmático possui ribosomas presos à sua superfície, recebendo o nome de retículo endoplasmático rugoso. *O* retículo endoplasmático liso *não apresenta ribosomas na superfície e, em geral, suas cisternas têm aspecto tubular. Uma das funções do retículo endoplasmático é isolar, nas cisternas, as proteínas que poderiam danificar o citoplasma, como, por exemplo, as enzimas digestivas. O retículo endoplasmático liso participa da síntese de lipídios e dos processos de desintoxicação, tornando inócuas certas moléculas tóxicas que penetram ou se formam no organismo.*

O aparelho de Golgi é constituído por cisternas achatadas e empilhadas, formando um conjunto com uma face convexa (cis) e outra côncava (trans). A face convexa recebe as vesículas transportadoras que trazem o material das cisternas do retículo endoplasmático. Da face côncava, brotam vesículas muito maiores contendo o material depois de processado no aparelho de Golgi.

São múltiplas as funções do aparelho de Golgi. Ele dá os retoques finais em muitas macromoléculas sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso, removendo e adicionando grupamentos diversos a essas macromoléculas. Muitas vezes ele concentra o material sintetizado, formando grânulos de secreção.

lisosomas, grânulos dos leucócitos e outros, onde o material fica condensado e ocupa menor espaço no citoplasma.

Basicamente, as células sintetizam proteínas para uso próprio e para exportação. No último caso estão as moléculas estruturais da substância extracelular, os hormônios, as enzimas digestivas e outras proteínas que vão agir fora das células que as produziram. Enquanto estão dentro da célula as proteínas para exportação devem ser isoladas do citoplasma, onde não teriam função, poderiam dificultar os processos celulares e até mesmo causar a morte da célula. Essas proteínas são isoladas primeiro nas cisternas do retículo endoplasmático rugoso e, depois, nas cisternas do complexo de Golgi e nos grânulos de secreção.

As proteínas para a digestão intracelular, depois de passarem pelo complexo de Golgi, são armazenadas e isoladas nos lisosomas (v. Cap. 5).

As células sintetizam polissacarídeos para servir de reserva nutritiva (glicogênio) e, também, como parte importante das moléculas de proteoglicanas e glicoproteínas. As partes glicídicas das proteoglicanas e das glicoproteínas são produzidas no retículo endoplasmático rugoso e no complexo de Golgi.

A secreção celular é um processo que geralmente envolve a síntese de alguns tipos específicos de moléculas, que são eliminados da célula produtora por exocitose. Mas, em alguns casos, a secreção é apenas a transferência ativa e seletiva de moléculas simples e íons do fluido extracelular para o interior dos dutos glandulares, podendo passar daí para o exterior do organismo. Muitas vezes, o transporte ativo e seletivo ocorre simultaneamente com a síntese e extrusão de macromoléculas. As células acinosas do pâncreas, por exemplo, secretam proporções variáveis de íons transportados ativamente e macromoléculas (enzimas digestivas), sintetizadas nas próprias células acinosas. Seja por simples transporte, seja por síntese de moléculas, o processo de secreção sempre consome energia proveniente de hidrólise de ATP.

Bibliografia

ALBEIJON, C. A. and HIRSCHBERG, C. B. Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem. Sci.*, *17*:32, 1992.

ALBERTS, B. *et al. Molecular Biology of the Cell.* 3rd ed. Garland Press, 1994.

AMARA, J. F. *et al.* Intracellular trafficking defects in human disease. *Trends Cell Biol.*, 2:145, 1992.

BAINTON, D. F. and FARQUHAR, M. G. Segregation and packing of granule enzyme in eosinophilic leucocytes. *J. Cell. Biol. 45*:54, 1970.

BLOGEL, G. and DOBBERSTEIN, B. Transfer of proteins across membranes. *J. Cell. Biol.*, *67*:835, 1975.

DOWHAN, W. Phospholipid exchange proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, *3*:621, 1991.

DUNPHY, W. G. and ROTHMAN, J. E. Compartmental organization of the Golgi stack. *Cell*, *42*:13, 1985.

GILMORE, R. Protein translocation across the endoplasmic reticulum. A tunel with toll booths at entry and exit. *Cell*, *75*:589, 1993.

GRIFFITHS, G. and SIMONS, K. The trans Golgi network sorting at the exit side of the Golgi complex. *Science*, *234*:438, 1986.

JONES, A. L. and FAWCETT, D. W. Hypertrophy of the agranular endoplasmic reticulum in hamster liver induced by phenobarbital. *J. Histochem. Cytochem*, *14*:215, 1966.

JUNQUEIRA, L. C. U. Control of cell secretion. *In* L. H. Schneyer and C. A. Schneyer (eds.). *Secretory Mechanisms of Salivary Glands.* Acad. Press, 1967.

PELHAM, H. R. B. and MUNRO, S. Sorting of membrane proteins in the secretory pathway. *Cell*, *75*:603, 1993.

ROTHMAN, J. E. The compartimental organization of the Golgi apparatus *Sci. Am.*, *253*:84, 1985.

ROTHMAN, J. E. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*, *372*:55, 1994.

WHITE, J. M. Membrane fusion. *Science*, *258*:917, 1992.

11

Divisão de Trabalho Entre as Células. Diferenciação

ROTEIRO

- *A diferenciação leva ao aparecimento de células especializadas para realizar determinadas funções.*
- *Os metazoários simples possuem poucos tipos celulares.*
- *Os espongiários são constituídos de apenas cinco tipos de células, enquanto os mamíferos apresentam cerca de 200 tipos de células diferentes.*
- *Existe uma relação inversa entre o grau de diferenciação de uma célula e sua capacidade de formar outros tipos celulares (potencialidade).*
- *A diferenciação de determinada célula depende da expressão de certos genes e repressão de outros.*
- *Modulação é uma especialização celular facilmente reversível.*
- *Os fatores que influem na diferenciação podem ser intra- ou extracelulares.*
- *A medula óssea vermelha, onde se formam as células do sangue, é um bom modelo para o estudo da diferenciação após o nascimento.*
- *O nematóide* Caenorhabditis elegans, *com apenas 1 mm e 3.000 genes, é um animal muito favorável para o estudo da diferenciação celular durante a embriogênese.*

Neste capítulo, será estudada a divisão de trabalho entre as células que constituem o corpo dos seres pluricelulares. Essa distribuição de funções é conseqüência da **diferenciação celular**, que consiste basicamente no seguinte: à medida que se formam no organismo, certas células passam a exercer, com grande eficiência, funções que outras células também realizam, porém com eficiência menor. Por exemplo, todas as células são capazes de contrair seu citoplasma em resposta a estímulos diversos, pois a contratilidade é uma propriedade geral da matéria viva. No entanto, certas células aperfeiçoam de tal maneira sua capacidade de contração, que sua eficiência, nessa função, passa a ser centenas de vezes superior à das demais células. Essas células especializadas na contração, que surgem no embrião, são as células musculares. Do mesmo modo, há células diferenciadas para secreção (células glandulares), para a condução de impulsos (células nervosas), para o revestimento (células epiteliais) etc.

O processo de diferenciação iniciou-se durante a evolução, com o aparecimento dos primeiros seres multicelulares, que se admite originaram-se de colônias de seres unicelulares. Colônias de protozoários possivelmente originaram os animais, e colônias de algas unicelulares heterotróficas devem ter dado origem às plantas. Mesmo no presente momento, é possível encontrar exemplos dessa transição de seres unicelulares para seres pluricelulares. A alga pluricelular *Volvox* é um exemplo. Nessa alga, já se esboça um início de diferenciação, pois, apesar de ser constituída por células com o mesmo aspecto morfológico, não se trata de células inteiramente autônomas, uma vez que são incapazes de sobreviver isoladas.

O processo de diferenciação ocorreu gradualmente durante o longo período de evolução e, em suas linhas gerais, se repete na embriogênese. A evolução tem lugar paralelamente a um aumento na variedade das células que constituem o organismo animal. Os espongiários, por exemplo, são formados por apenas cinco tipos celulares, mas esse número foi aumentando durante o processo evolutivo, e o corpo de um mamífero tem cerca de 200 tipos de células diferentes.

A diferenciação aumenta a eficiência das células, mas torna-as dependentes umas das outras

Até certo ponto, o corpo de um animal pode comparar-se com uma sociedade evoluída, onde os indivíduos, associando-se cooperativa e competitivamente, exercem funções especializadas, como a de engenheiro, médico ou advogado. A diferenciação aumenta muito a eficiência do conjunto, mas torna as células dependentes umas das outras. Cada célula especializada trabalha principalmente na função que exerce com maior eficiência. O organismo animal se apresenta constituído por diversos tipos celulares, com funções específicas, todos eles derivados, por sucessivas divisões mitóticas, do óvulo fecundado ou **zigoto**.

Um ser humano adulto é formado por umas 10^{13} células, de aproximadamente 200 tipos diferentes.

Depois da fecundação, o zigoto sofre repetidas divisões, sem crescimento da massa total de protoplasma. Essas divisões pro-

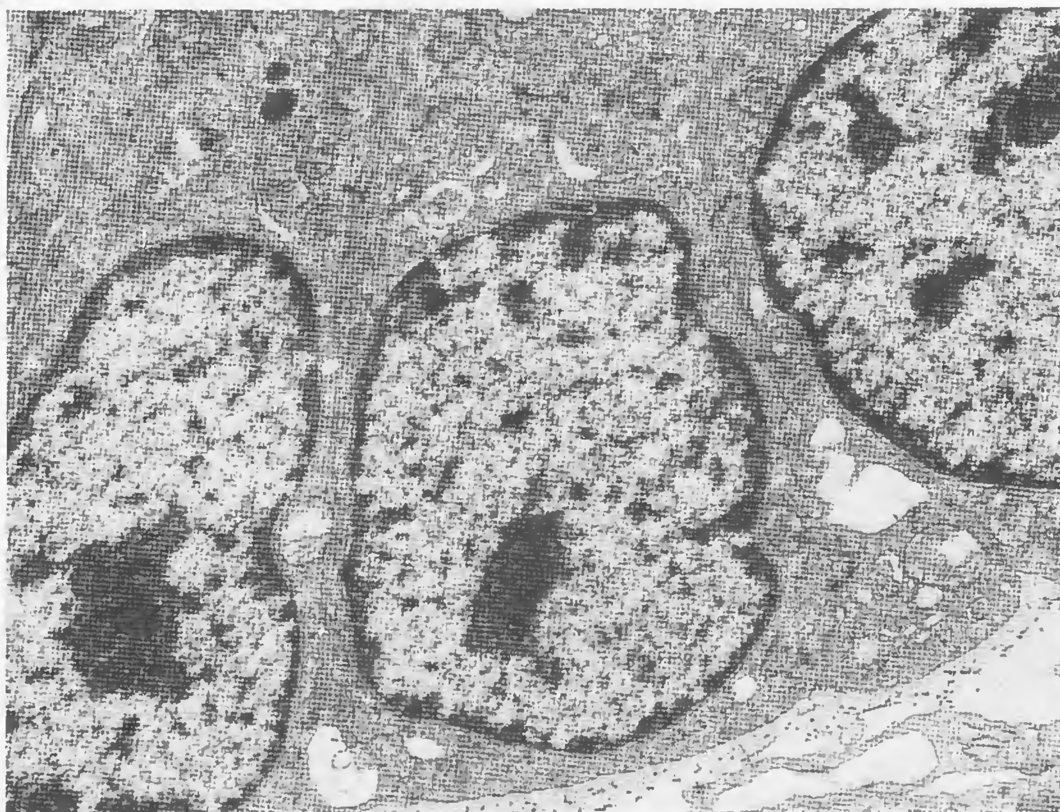


Fig. 11.1 Eletromicrografia da glândula salivar parótida de feto. Ainda pouco diferenciada, as células são ricas em polirribosomas, porém as outras organelas são pouco desenvolvidas. Comparar com a Fig. 11.2 (16.000 ×).

duzem células cada vez menores, denominadas **blastômeros**, até que se forma uma massa celular chamada **mórula**. A mórula adquire uma cavidade, passando ao estado de **blástula**.

Nos animais, a diferenciação celular começa na fase embrionária de gástrula

Em seguida à blástula, ocorre um processo chamado **gastrulação**, que leva à formação de um embrião com três folhetos germinativos, denominado **gástrula**. A gastrulação, que estabelece uma condição nova para as células do embrião, caracteriza-se pelo seguinte:

1. início de intensa síntese de proteínas e RNA, com o conseqüente crescimento do embrião;
2. movimentos celulares intensos que originam os três folhetos germinativos;
3. fixação do destino das células embrionárias.

A síntese de RNA e de proteínas é insignificante até o início da gastrulação, quando o embrião começa a crescer. Isso implica que, nas fases embrionárias que precedem a gastrulação, não ocorre transcrição nem tradução da informação genética contida no DNA (não há síntese de RNA nem de proteínas).

Os movimentos celulares são muito ativos na gastrulação, levando ao estabelecimento dos três folhetos embrionários: **ectoblasto**, **mesoblasto** e **endoblasto**. Todavia, movimentos celulares ainda mais complexos, por envolverem distâncias maiores, ocorrem em fases embrionárias mais avançadas.

A fixação do destino das células embrionárias na gastrulação é particularmente importante, pois indica que, durante a gastrulação, acontecem modificações, nas células embrionárias, que determinam seu futuro. Esse fato é observado quando se transplantam partes de um embrião para outro da mesma espécie e na mesma fase embrionária. Quando essa operação é feita antes da gastrulação, as células se desenvolvem de acordo com os lugares para onde foram transplantadas; entretanto, se o transplante for feito depois da gastrulação, as células vão diferenciar-se de acordo com o lugar de onde foram retiradas, não seguindo a diferenciação das células adjacentes no lugar do transplante. Isto significa que, na fase de gástrula, há uma **determinação** do destino das células, que não pode ser facilmente alterado. Antes da gástrula, ao contrário, as células transplantadas se tornam semelhantes às do lugar onde foram colocadas. Todavia, o processo de diferenciação é gradual e, mesmo no animal adulto, as diversas células apresentam graus diversos de diferenciação.

A diferenciação celular é um processo durante o qual ocorrem modificações moleculares e morfológicas, com aumento da complexidade celular. Do ponto de vista morfológico, as organelas têm importante papel, dispondo-se essas estruturas, qualitativa e quantitativamente, de modo a aumentar a eficiência funcional das células. Por exemplo, as mitocôndrias são abundantes e se concentram nas regiões citoplasmáticas onde ocorre alto

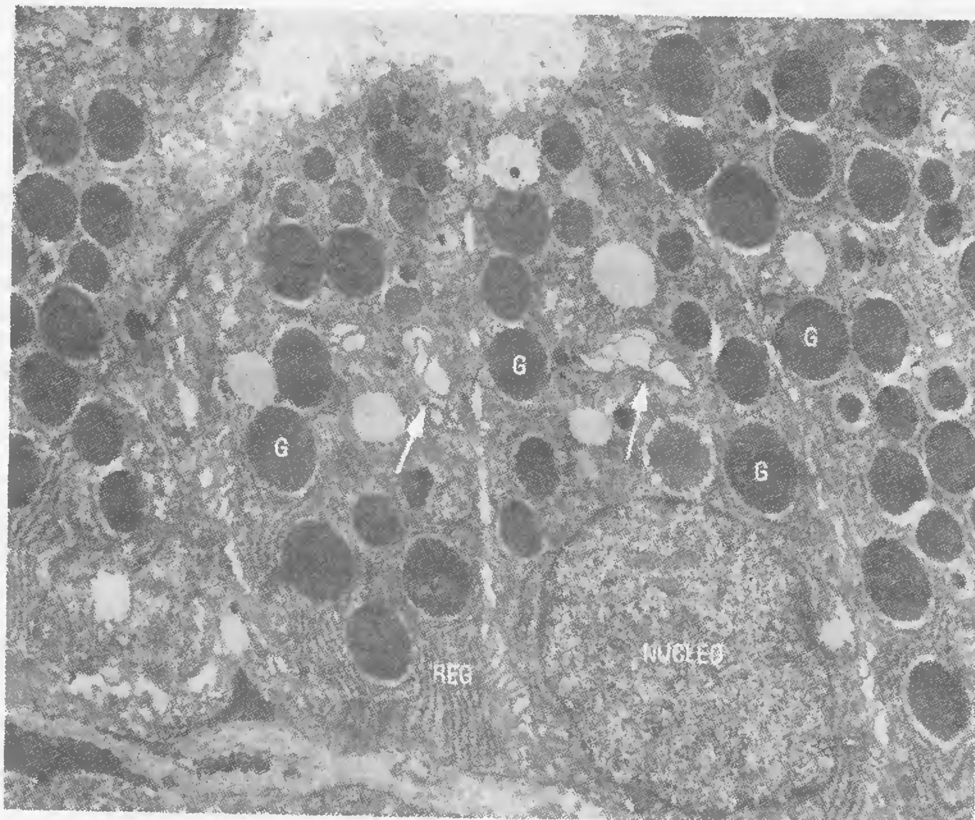


Fig. 11.2 Eletromicrografia da glândula salivar parótida de animal adulto. Nessas células, especializadas na secreção de proteínas, a diferenciação acarreta desenvolvimento acentuado do retículo endoplasmático rugoso (**REG**) e do aparelho de Golgi (**setas**). Aparecem numerosos grânulos de secreção (**G**). A abundância e a disposição estratégica das organelas contrasta com o aspecto da célula menos diferenciada (comparar com a Fig. 11.1) (8.000 ×).

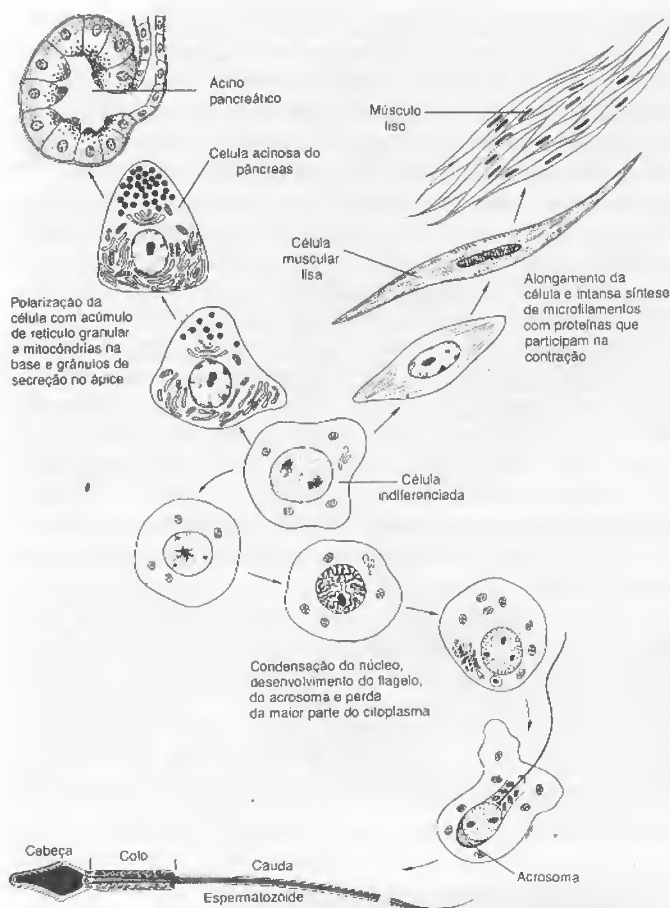


Fig. 11.3 Diferenciação de uma célula indiferenciada no sentido de formar **células secretoras, células contráteis** e **células móveis**. A célula indiferenciada pode modificar-se para formar uma célula secretora, como a célula acinosa do pâncreas. O processo de diferenciação é gradual e caracteriza-se pelo desenvolvimento das organelas relacionadas com a síntese e a condensação das proteínas para exportação. A célula, pouco a pouco, toma forma piramidal, torna-se rica em retículo endoplasmático rugoso, seu aparelho de Golgi aumenta de tamanho e aparecem grânulos de secreção. Após a diferenciação, a célula se torna polarizada, isto é, passa a apresentar uma porção basal e uma porção apical morfologicamente diferentes. A diferenciação para formar células musculares lisas (contráteis) caracteriza-se por um alongamento da célula e pelo aparecimento, no citoplasma, de microfilamentos que participam da contração. A diferenciação do espermatozóide leva à formação de uma célula pequena, porém com longa cauda móvel, cuja agitação impulsiona o espermatozóide. A parte cilíndrica, denominada colo, entre a cabeça e a cauda do espermatozóide, contém as mitocôndrias, que fornecem energia (ATP) para a movimentação.

consumo de energia, e o retículo endoplasmático rugoso aumenta nas células que secretam proteínas.

As Figs. 11.1 e 11.2 ilustram diferenças morfológicas existentes entre uma célula pouco diferenciada e uma célula muito diferenciada. As alterações graduais que ocorrem na diferenciação das células especializadas na movimentação, na secreção e na contração estão esquematizadas na Fig. 11.3.

Diferenciação é o grau de especialização; potencialidade é a capacidade de originar outros tipos celulares

A diferenciação será mais bem compreendida considerando-se que cada célula é dotada de duas características: a **diferenciação** e a **potencialidade.** Diferenciação é o grau de especialização da célula; a potencialidade é a capacidade que a célula tem de originar outros tipos celulares. Em qualquer célula, quanto maior for a potencialidade, menor será a diferenciação, e vice-versa. O óvulo e os primeiros blastômeros da maioria das espécies animais podem originar qualquer tipo celular. Essas células possuem 100% de potencialidade e seu grau de diferenciação é zero. O óvulo e os blastômeros dessas espécies são células **totipotentes.** No outro extremo estão, por exemplo, as células nervosas e as do músculo cardíaco, que perderam até a capacidade de divisão mitótica, não podendo originar sequer outras células iguais. Essas células são 100% diferenciadas e sua potencialidade é igual a zero. Os exemplos dados são extremos, e a maioria das células exibe graus intermediários de diferenciação e potencialidade.

Em geral, as células muito diferenciadas se dividem pouco

Existe, em geral, uma relação inversa entre o grau de diferenciação de uma célula e sua capacidade de multiplicação. As células menos diferenciadas, como as dos embriões muito jovens, multiplicam-se intensamente. Por outro lado, os neurônios e as células musculares cardíacas, que são células altamente diferenciadas, não se multiplicam.

No entanto, esse antagonismo aparente, entre diferenciação e capacidade de divisão mitótica, não é absoluto. Por exemplo, mesmo no animal adulto, as células acinosas da glândula salivar parótida (Fig. 11.4) e as células hepáticas, que são muito diferenciadas, ainda se dividem por mitose, sobretudo quando estimuladas. A extirpação experimental de parte do fígado de um rato adulto, por exemplo, provoca intensa proliferação das células hepáticas restantes, que reconstituem inteiramente a parte extirpada do fígado.

O programa genético contido no DNA dirige a diferenciação celular

A simples multiplicação dos blastômeros, por autocópia, não seria capaz de originar um organismo. Mas o zigoto (óvulo fecundado) possui no seu DNA toda a informação necessária, e é potencialmente capaz de todas as funções que caracterizam as células diferenciadas do organismo. Por outro lado, sabe-se que as células especializadas perdem a capacidade de expressar a maior parte da informação presente no seu DNA, limitando-se a expressar apenas aqueles aspectos diretamente relacionados com sua própria especialização. Por exemplo, um eritroblasto mobiliza a parte de seu patrimônio gênico necessária para a síntese da hemoglobina, porém é incapaz de muitas outras funções metabólicas. A expressão da informação hereditária, contida em seu

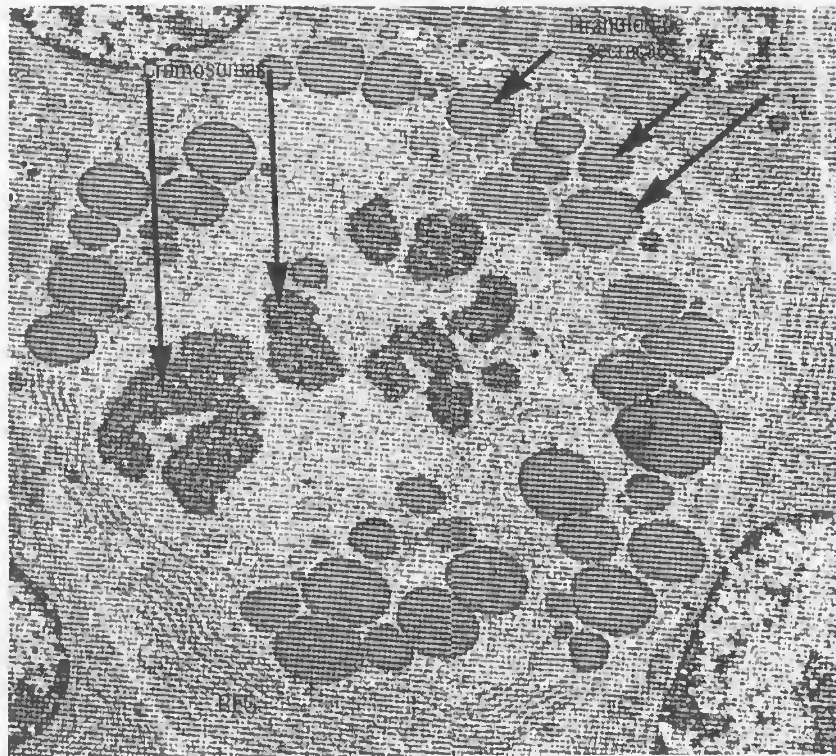


Fig. 11.4 Micrografia eletrônica de uma célula diferenciada da glândula salivar parótida, em mitose. Observar os grânulos de secreção e os cromosomas. Esta figura demonstra que uma célula diferenciada (com grânulos de secreção) pode multiplicar-se. (Cortesia de R. S. Redman e L. M. Sreebny.)

DNA, dedica-se, principalmente, à síntese das enzimas necessárias para a produção do heme, assim como para a produção do mRNA das globinas, que, em conjunto, constituem a hemoglobina.

O DNA é constantemente reprimido em sua expressão global, tanto nas células embrionárias como nas células em diferenciação ou já diferenciadas. Num organismo adulto, cada célula tem informação em seu DNA capaz de sintetizar uma variedade de moléculas muito maior do que ela, de fato, sintetiza. Seria desastroso, por exemplo, se uma célula nervosa produzisse queratina, uma família de proteínas que se expressa nas células da epiderme. Embora a célula nervosa tenha os genes que codificam as queratinas, é evidente que eles estão reprimidos.

A diferenciação resulta de uma série de expressões gênicas controladas

O que vem a ser a diferenciação celular? Em termos gerais, a diferenciação celular é o conjunto de processos que transformam uma célula embrionária em uma célula especializada. Como não é possível que se expresse algo que não estivesse antes programado no DNA, pode-se dizer que a diferenciação celular é o resultado da atuação de uma série de controles de expressão que tendem a especializar a fisiologia e também a morfologia de uma célula, capacitando-a eficazmente para uma determinada função em detrimento de muitas outras.

O caminho que conduz uma célula, desde o estado embrionário até a especialização, consiste em uma série de expressões e repressões gênicas controladas. Quais são estes mecanismos e como eles se integram para originar o organismo são os problemas centrais da diferenciação celular.

Durante a diferenciação, há ativação de certos genes e inativação de outros

Como podem os genes controlar o processo que leva uma célula única a dar origem a um organismo constituído por células tão diferentes? De imediato, duas hipóteses poderiam ser sugeridas. Em primeiro lugar, poderia haver uma perda de genes durante as divisões mitóticas que ocorrem durante a diferenciação. A diferenciação celular seria conseqüência de uma perda da informação gênica, de modo que o DNA de uma célula nervosa, por exemplo, diferiria do DNA de uma célula epitelial. Essa hipótese não é verdadeira, pois todas as células de um mesmo animal, independentemente de sua diferenciação, contêm os mesmos genes. As técnicas de transplante nuclear permitiram demonstrar que os núcleos de células diferenciadas, por exemplo, de células epiteliais do intestino dos girinos, enxertados em óvulos anucleados da mesma espécie, podem chegar a formar um sapo normal. Isso não seria possível se o núcleo da célula epitelial houvesse perdido parte de seus genes durante a diferenciação (Fig. 11.5).

A segunda hipótese admite que as modificações celulares que têm lugar na diferenciação resultam da inativação de certos genes e da ativação de outros. De acordo com essa hipótese, que é a correta, todas as células de um organismo têm os mesmos ge-

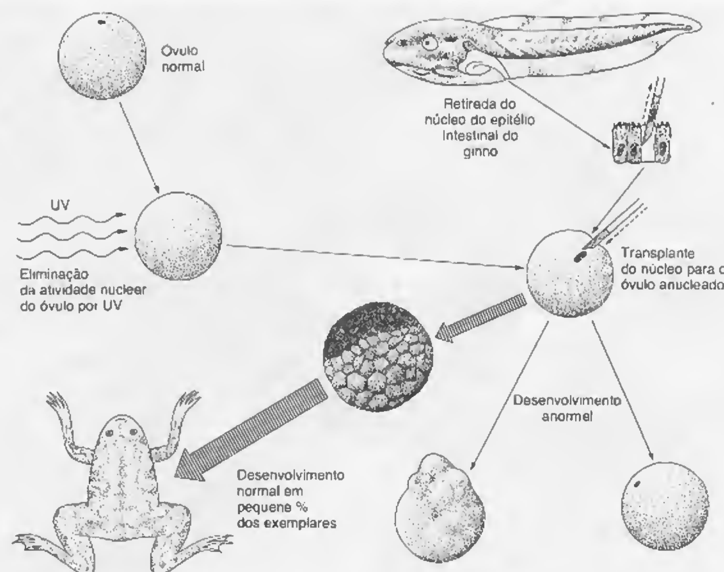


Fig. 11.5 Esquema ilustrativo de transplante nuclear. Neste experimento, um óvulo de rã foi irradiado com ultravioleta para destruir seu núcleo. Em seguida, e por meio de uma micropipeta, foi enxertado, no óvulo irradiado, um núcleo de célula epitelial do intestino de girino. O óvulo com o núcleo da célula epitelial iniciou seu desenvolvimento e produziu uma rã normal. Este experimento demonstra que o núcleo transplantado continha todos os genes que estavam presentes no zigoto.

nes. As células nervosas são diferentes das células musculares porque, em cada uma delas, os genes ativos são diferentes. Essa diferença de atividade gênica se traduz na transcrição (síntese de mRNA) de certos genes, enquanto outros não são transcritos. Os mRNAs diferem de uma célula diferenciada para outra. Porém, além da ativação de uns genes e inativação de outros, foi observado ainda que as moléculas de mRNA diferem pela ação de outros mecanismos. Sabe-se que as moléculas precursoras do mRNA inicialmente formadas (**RNA heterogêneo, hnRNA**) são processadas por "splicing", dando origem a diversos mRNAs e, portanto, a diversas proteínas pela transcrição de um mesmo gene. Outro fator que influi na especialização da célula é a maior ou menor estabilidade dos mRNAs. O RNA mensageiro mais estável, cuja molécula dura mais tempo antes de ser degradada, possibilita a síntese de maior quantidade da proteína por ele codificada e, assim, influi mais poderosamente na atividade celular.

Modulação é uma "diferenciação" reversível

As culturas de células vegetais demonstraram que as células isoladas de diversas origens, como folhas e raízes, podem dar lugar a plantas completas. Portanto, essas células não perderam irreversivelmente a capacidade embrionária de diferenciação. Sua diferenciação não conduziu a um beco sem saída. A esse tipo de diferenciação, facilmente reversível, dá-se o nome de **modulação**.

Também existem vários exemplos de modulação em tecidos animais, e um dos mais conhecidos é a transformação reversível do epitélio pseudo-estratificado ciliado das vias respiratórias em epitélio estratificado pavimentoso, devido à carência de vitamina A. A adição dessa vitamina à dieta promove o retorno do epitélio ao tipo original. Essa mesma transformação do epitélio das vias respiratórias ocorre devido ao hábito de fumar cigarros. Essa modificação no epitélio das vias respiratórias, produzida pelo fumo, é considerada como um primeiro estágio na formação de câncer do pulmão causado pelo fumo.

Outro exemplo é o epitélio vaginal que, quando estimulado por estrógeno (hormônio feminino), transforma-se de epitélio não-queratinizado em epitélio queratinizado, fenômeno este de grande aplicação clínica, pois a quantidade de células queratinizadas em relação às não-queratinizadas, em esfregaços do conteúdo vaginal, pode ser utilizada como um índice da atividade estrogênica ovariana.

A natureza reversível da modulação sugere que certos genes foram apenas fracamente reprimidos, podendo facilmente ser ativados sob a ação de certos estímulos. Esse caráter contrasta com a forte estabilidade de certos estados de diferenciação, como o observado no tecido nervoso, cujas células perderam sua potencialidade e muitos de seus genes estão definitivamente reprimidos, não podendo ser ativados de novo.

Que fatores controlam os processos de diferenciação celular?

A diferenciação é controlada por fatores intrínsecos e extrínsecos. Os intrínsecos se encontram nas próprias células em diferenciação, ao passo que os extrínsecos resultam de sinais provenientes de outras células, da matriz extracelular do organismo em diferenciação ou de agentes provenientes do meio ambiente.

Os fatores intrínsecos derivam do programa existente no DNA da célula ou de material acumulado no seu citoplasma. A pré-programação do DNA é bem evidente na diferenciação em determinadas culturas de tecidos. São exemplos as culturas de células musculares precursoras que se diferenciam gradualmente *in vitro*, gerando fibras musculares diferenciadas. Essa pré-programação também ficou bem evidente nos estudos embriológicos

realizados no nematóide *Caenorhabditis elegans*, que será citado adiante.

A participação de substâncias acumuladas no citoplasma é bem conhecida, e os exemplos mais evidentes derivam de estudos realizados nos ovos de moluscos, ascídeos e nematóides. Esses animais apresentam ovos cujo citoplasma tem regiões características, com aspectos diferentes, devido à presença localizada de substâncias diversas (entre as quais pigmentos), o que lhes valeu o nome de **ovos em mosaico**. Por exemplo, nos ovos da *Ascidia styela* observam-se seis regiões de cores diferentes, e a análise do desenvolvimento destes ovos mostrou que cada região gera um tecido diferente, a saber, a notocorda, o tecido nervoso, o mesoderma, o músculo, o ectoderma e o endoderma.

Já os **fatores extrínsecos** da diferenciação derivam do organismo onde se processa a diferenciação (fatores locais), ou provêm do meio ambiente (fatores ambientais). Os fatores locais resultam da ação de células que agem enviando, por meio de moléculas, sinais que induzem determinados tecidos a se diferenciarem em determinada direção, ou, então, esses sinais derivam da matriz extracelular. Seguem-se exemplos da ação de fatores locais.

Um caso bem conhecido se refere à ação que a notocorda exerce sobre o ectoderma que a recobre, no fim da fase de gástrula, induzindo-o a formar a placa neural, origem do futuro sistema nervoso. Quando esse contato não ocorre (no processo denominado de exogastrulação), o embrião evolui como uma massa amorfa.

Existem muitos outros exemplos desse tipo de interação celular no desenvolvimento dos rins, olhos etc. O interessante é que esses processos de indução se sucedem ao longo da embriogênese, determinando uma seqüência ordenada de eventos. É o caso, por exemplo, da vesícula óptica, que induz a formação do cristalino que, por sua vez, induz a formação da córnea. Outro exemplo bem estudado diz respeito à diferenciação do pâncreas e das glândulas salivares. Verificou-se que o broto epitelial que irá gerar esses órgãos só se desenvolve, formando tecido glandular, quando em contato com tecido conjuntivo embrionário. Quando se coloca, entre o broto epitelial e o tecido conjuntivo, uma folha de material impermeável, não ocorre a diferenciação de células secretoras. Quando, porém, se interpõe entre esses dois tecidos um delgado filtro (*milipore*) que permite a passagem de macromoléculas, mas não de células, a diferenciação se processa, deixando bem claro que um mensageiro químico produzido por um tecido agiu no seu vizinho. Além da ação de células vizinhas, já descrita, sabe-se que vários hormônios, fatores de crescimento, substâncias imunogênicas etc., produzidos em células distantes, ativam ou inibem a expressão de um gene ou bateria de genes, constituindo um complexo de fatores que interagem, tornando o fenômeno de diferenciação extremamente complexo.

A ação da matriz extracelular sobre a diferenciação é bem exemplificada nos trabalhos utilizando culturas de tecidos realizados em frascos previamente recobertos com componentes da matriz, relatados no Cap. 12, e onde se observou nítido efeito de componentes da matriz sobre o comportamento e diferenciação das células.

Diversos fatores do meio ambiente podem afetar a diferenciação. Esses fatores são de natureza variada e podem ser físicos (raios X, radioatividade, temperatura), químicos (drogas, substâncias poluentes, medicamentos) e biológicos (infecção viral). São notórios os efeitos deletérios das radiações sobre a diferenciação nos embriões e fetos, causando malformações várias. Por isso, é preciso evitar que mulheres grávidas sejam expostas às radiações, como os raios X. As substâncias tóxicas oriundas da poluição ambiental ou medicamentos (como a talidomida) também podem produzir malformações. Como é muito difícil obter dados sobre a teratogenicidade (*terato*, malformação, e *gênico*, gerador) de drogas na espécie humana, procura-se evitar o uso indiscriminado de medicamentos durante a gravidez. Das várias infecções virais que levam à malformação, a rubéola é a mais conhecida, podendo causar surdez e cegueira. Os agentes teratogênicos agem, principalmente, nos três primeiros meses da gravidez, uma vez que é durante esse período que os processos de diferenciação ocorrem com maior freqüência e intensidade. Os agentes teratogênicos podem agir sobre os genes promovendo mutações, ou então podem inibir a atividade de enzimas que desempenham papel na diferenciação.

Um modelo de diferenciação bem estudado e cujo conhecimento tem aplicação direta na área biomédica é a produção de células do sangue ou hemocitopoese (*hemo*, sangue, *cito*, célula, e *poese*, produção), que será analisada a seguir.

A produção das células do sangue (hemocitopoese) é um modelo de diferenciação bem estudado

Em estruturas como a medula óssea vermelha e o revestimento do intestino e do estômago, cujas células se reproduzem rapidamente e se diferenciam gerando vários tipos celulares, o conceito de **célula fonte** ou **célula tronco** *(stem cell)* é importante para compreender a diferenciação celular. As células tronco são células pouco diferenciadas, que se dividem continuadamente durante a vida do animal, produzindo células que podem evoluir para gerar células irreversivelmente diferenciadas. Todavia, um certo número de células tronco, originadas por divisão das preexistentes, permanecem como tais, não se diferenciando e, assim, mantendo o *pool* de células pouco diferenciadas. Por isso são chamadas de células fonte. Se todas as células tronco que se dividissem, entrassem em diferenciação, a reserva de células tronco desapareceria.

O estudo das células fonte da medula óssea vermelha (a medula óssea amarela é constituída de células adiposas e não forma células sangüíneas) se desenvolveu recentemente, graças às técnicas que permitiram experimentos de hemocitopoese induzida *in vivo* e *in vitro*. Os experimentos *in vivo* foram feitos com a injeção de medula óssea normal em camundongos cujas células hemocitopoéticas tinham sido previamente destruídas por doses muito fortes de raios X. Nessas condições se desenvolveram colônias hemocitopoéticas, originárias do doador, no baço dos animais receptores. Os estudos *in vitro* foram realizados em culturas em meio semi-sólido, previamente recoberto por células do estroma da medula óssea, criando assim condições ecológicas para a hemocitopoese.

Uma extensa série de trabalhos utilizando essas técnicas demonstrou que as células fonte, em meio adequado e quando estimuladas por fatores de crescimento, proliferam, gerando vários tipos de leucócitos.

A célula fonte da medula óssea vermelha se divide, originando **células linfóides**, que gerarão os linfócitos, e **células mielóides**, que darão origem aos leucócitos não-linfóides (granulócitos e monócitos), às hemácias e aos megacariócitos. O megacariócitos são células muito grandes, formadoras das plaquetas do sangue.

Os dois tipos celulares derivados das células fonte da medula óssea vermelha (célula linfóide e célula mielóide) são chamados

Tabela 11.1 Seqüência de eventos durante a hemocitopoese

CÉLULA FONTE	CÉLULA MULTIPOTENTE	CÉLULA PROGENITORA	CÉLULA PRECURSORA (BLASTO)	CÉLULA ADULTA
Os três tipos celulares acima apresentam morfologia semelhante, parecendo linfócitos				Células morfologicamente diferenciadas
Estas células têm atividade mitótica baixa, são auto-renováveis e raras na medula óssea		Células com atividade mitótica alta, auto-renováveis na medula e org. linfóides, mono- ou bipotentes	Alta atividade mitótica não-auto-renovável; monopotente; freqüente na medula e órgãos linfóides	Abundante no sangue e org. hemocitopoéticos. Ausência de mitoses
Célula linfóide multipotente	Migra p/órgãos linfóides (baço, timo e nódulos linfáticos)	Célula produtora de linfócitos (LCFC)	Linfoblasto	Linfócitos B e T
		Célula formadora de colônias de eritrócitos (ECFC)	Eritoblasto	Eritrócitos
		Célula produtora de megacariócitos	Megacarioblasto	Plaquetas no sangue
		MCFC Colônia de monócitos	Promonócito	Monócitos
Célula fonte		MGCFC GCFC Colônia de neutrófilos	Mielócito neutrófilo	Neutrófilos
	Célula mielóide multipotente fica na medula óssea	EoCFC Colônia de eosinófilos	Mielócito eosinófilo	Eosinófilos
		BCFC Colônia de basófilos	Mielócito basófilo	Basófilos

de **células multipotentes**. As células multipotentes linfóides migram para os órgãos linfóides (baço, timo, linfonodos, tonsilas), onde se multiplicarão gerando os vários tipos de linfócitos (Tabela 11.1).

A multiplicação das células multipotentes originará células com potencialidade mais reduzida, capazes de produzir apenas um ou dois tipos de células (**células progenitoras uni-** ou **bipotentes**), que, por sua vez, gerarão as células **precursoras** (ou blastos), nas quais já surgem características morfológicas indicando o tipo celular definitivo no qual se transformarão. São blastos, por exemplo, os mielócitos neutrófilos, eosinófilos e basófilos (Tabela 11.1).

As células fonte e as multipotentes proliferam em ritmo apenas suficiente para manter a sua população, que é relativamente pequena (na medula de camundongos, apenas 0,1 a 0,3% da população é constituída por células multipotentes). O ritmo mitótico se acelera nas células progenitoras e precursoras, gerando grande quantidade de células sangüíneas (3×10^9 eritrócitos e $0{,}8 \times 10^9$ granulócitos/kg/dia na medula óssea humana).

A hemocitopoese foi estudada *in vivo* e *in vitro*, com a tecnologia já mencionada, nas colônias formadas no baço, ou em cultura de tecido. Assim, foram obtidas colônias derivadas de células multipotentes que, a partir de uma só célula, produzem eritrócitos, leucócitos não-linfóides e megacariócitos.

Aparecem também colônias puras de eritrócitos, de macrófagos ou de eosinófilos, derivados de células progenitoras unipotentes. Surgem, ainda, colônias derivadas de células progenitoras bipotentes constituídas, por exemplo, de macrófagos e granulócitos (Fig. 11.6). Às células que formam colônias, convencionou-se chamar de **células formadoras de colônias** (*colony forming cells*, **CFC**).

Habitualmente utiliza-se abreviação CFC precedida pela inicial da célula, ou células produzidas, por exemplo, **MCFC** (produz monócitos), **EoCFC** (produz eosinófilos) e **MGCFC** (produz monócitos e granulócitos) (Tabela 11.1).

Além da programação gênica preexistente nas células envolvidas, a hemocitopoese depende de dois tipos de fatores extracelulares:

1. a presença de condições ambientais; e
2. a presença de fatores de crescimento.

As condições ambientais são preenchidas pelas células do estroma dos órgãos hematopoéticos que, por sua vez, produzem os componentes da matriz extracelular, como colágeno, fibronectina e laminina, estudados no Cap. 12.

Uma vez satisfeitas essas condições ambientais, o desenvolvimento da hemocitopoese depende de substâncias que afetam a multiplicação e diferenciação celulares. Essas substâncias receberam os nomes genéricos de **fatores de crescimento, fatores estimuladores de formação de colônias** (*colony stimulating factors*, **CSF**) ou **hematopoetinas**. Os fatores de crescimento apresentam estrutura molecular variada e complexa, e agem principalmente de três maneiras:

1. estimulando a divisão celular (atividade mitogênica) principalmente de células progenitoras e precursoras;
2. promovendo a diferenciação de células imaturas; e
3. acentuando as atividades funcionais dos leucócitos maduros.

Essas três propriedades podem estar presentes, em graus variáveis, no mesmo fator de crescimento.

Os genes humanos de vários fatores de crescimento já foram isolados e clonados, com produção em massa de alguns desses fatores, permitindo a análise de sua ação *in vivo* e *in vitro*. A utilidade desses fatores em medicina é óbvia, desde que seja possível obtê-los em quantidade, o que já é possível para certos fatores.

As principais características de cinco fatores de crescimento muito estudados se encontram na Tabela 11.2. Ensaios clínicos demonstraram que esses fatores são capazes de aumentar a população celular da medula óssea (onde se formam as células do sangue) e do sangue circulante nos vasos sangüíneos. Devido às já mencionadas múltiplas funções exercidas por esses fatores, abre-se um amplo campo para a utilização deles em terapêutica

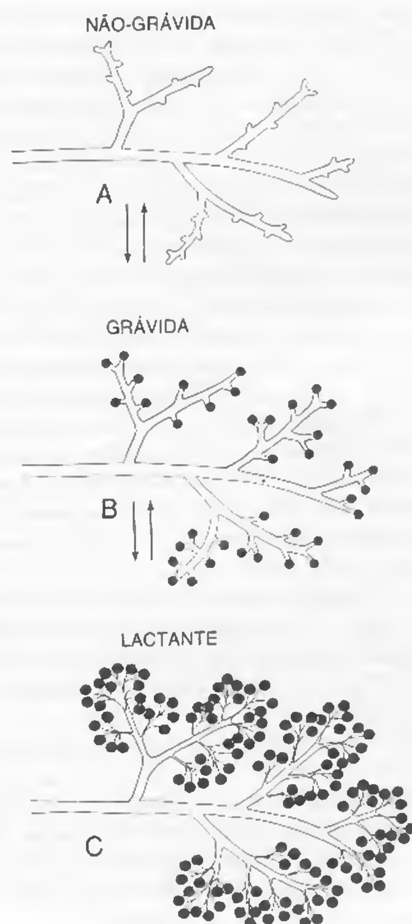


Fig. 11.6 Desenho esquemático ilustrando os diferentes estágios de diferenciação da glândula mamária na mulher adulta. Em **A**, a situação na mulher não-grávida, apresentando-se a glândula constituída essencialmente por ductos. Durante a gravidez (**B**) proliferam os ácinos, que iniciam a secreção de leite, antes do parto, permanecendo assim durante a lactação. **C**. Glândula mamária da mulher que está amamentando, com numerosos ácinos secretores, representados em negro. Uma vez terminada a lactação, ocorre a regressão para a situação **A**.

Tabela 11.2 Mostrando as características principais dos fatores de crescimento (*colony stimulating factors* — CSF)

Nome	Localização do gene responsável no cromosoma humano, e células produtoras	Atividade biológica principal
Granulócito (GCSF)	Cromosoma 17 Macrófagos Endotélio Fibroblasto	Estimula a formação de neutrófilos *in vivo* e *in vitro* Estimula o metabolismo dos neutrófilos Estimula células malignas (leucêmicas)
Granulócito e macrófago (GMCSF)	Cromosoma 5 Linfócitos T Endotélio Fibroblastos	Estimula a produção de neutrófilo e monócitos *in vivo* e *in vitro*
Macrófago (MCSF)	Cromosoma 5 Macrófagos Endotélio Fibroblastos	Estimula a formação de macrófagos *in vitro* Aumenta a atividade antitumoral dos macrófagos
Interleucina 3 (IL3)	Cromosoma 5 Linfócitos T	Estimula *in vitro* e *in vivo* a formação de células da medula óssea
Eritropoetina (EPo)	Cromosoma 7 Células intersticiais do rim	Estimula a fomação de eritrócitos *in vivo* e *in vitro*

Tabela 11.3 Utilização dos fatores de crescimento em terapêutica

1.	Aumentam a quantidade de células no sangue em situações nas quais ocorre a sua queda causada por doenças ou fatores externos, como devido à irradiação, quimioterapia etc.
2.	Aumentam a proliferação de células transplantadas da medula óssea, aumentando a eficiência destes transplantes
3.	Aumentam as defesas do organismo contra doenças infecciosas (incluindo a AIDS), doenças imunodeficientes e câncer
4.	Aumentam as defesas em doenças parasitárias

(Tabela 11.3). A Tabela 11.4 informa sobre fatores que desencadeiam e regulam a hemocitopoese na medula óssea vermelha. Antes da descoberta dos fatores de crescimento para as células formadoras do sangue, já tinham sido descritos os fatores do crescimento das células nervosas e epiteliais.

Em algumas doenças da hemocitopoese, pode ocorrer uma diminuição na proliferação de certas células da medula óssea, assim como aumento da proliferação de outras. Em conseqüência, o sangue apresenta excesso de umas células e falta de outras. A proliferação descontrolada de células hemocitopoéticas geradoras de leucócitos pode adquirir caráter de malignidade, gerando as **leucemias**. Nessas doenças, os leucócitos que se formam apresentam anormalidades morfológicas e funcionais.

Várias drogas utilizadas na quimioterapia do câncer, ou como antibióticos, podem deprimir drasticamente a hemocitopoese, razão pela qual o seu uso deve ser controlado com exames de sangue periódicos.

A produção anormal de fatores de crescimento participa de certos processos cancerosos nos quais excessos desses fatores, produzidos pelas próprias células tumorais, são implicados na exagerada atividade reprodutiva dessas células (estimulação autócrina).

O nematóide Caenorhabditis elegans *é um bom modelo para o estudo da diferenciação*

O nematóide *Caenorhabditis elegans* tem 1 mm de comprimento, constituição simples e ciclo de vida de três dias. É um animal que apresenta apenas os órgãos necessários para a sua alimentação e reprodução. O seu genoma, com seis pares de cromosomas, tem apenas 3.000 genes. O *Caenorhabditis elegans* tem 20 vezes mais DNA que uma bactéria, e 35 vezes menos que a espécie humana. Durante sua evolução embrionária (dentro do ovo), originam-se 550 células que vão gerar 3.000 células no adulto (1.000 somáticas e 2.000 germinativas). Como o animal é totalmente transparente, é possível acompanhar o desenvolvimento de cada célula. Todas as células já foram identificadas ao microscópio eletrônico pelo estudo de cortes seriados. A técnica dos cortes seriados consiste na obtenção de cortes de um órgão, ou de um pequeno animal, e no estudo, por exemplo, de 1 corte em cada 10, pois seria muito trabalhoso examinar todos os cortes. Através desses cortes, é possível reconstituir a imagem tridimensional do órgão, ou mesmo do pequeno animal inteiro.

Foi possível, assim, pela primeira vez, estudar a diferenciação de **todas** as células de um animal. Os resultados observados confirmam os princípios gerais já obtidos, muitas vezes por vias indiretas, e expostos anteriormente, pois demonstraram a importância da atividade gênica, da interação das células e da interação das células com o meio extracelular.

Por se tratar de animal de ciclo vital curto, é fácil analisar o efeito de mutações gênicas. Através dessa análise, foi possível demonstrar a existência de genes que controlam o desenvolvimento embrionário, entre os quais já foram distinguidos três grupos, com as seguintes ações:

1) genes de controle geral, cuja falha causa a morte precoce do embrião;
2) genes de função específica que controlam a expressão de proteínas específicas das células diferenciadas. A falha desses genes permite o desenvolvimento do embrião dentro de um plano de organização normal, mas certos tipos de células especializadas são defeituosas;
3) genes que regulam o plano de construção do corpo do animal, e a sua disfunção resulta em disposição e quantidade alteradas de células diferenciadas normais.

A diferenciação dos tecidos e órgãos se processa em ritmos diferentes nos vários compartimentos do organismo

É comum a impressão de que, logo após o nascimento, os órgãos encontram-se completamente diferenciados, e que só lhes

Tabela 11.4 Seqüência de condições e fatores que desencadeiam e regulam a atividade das células que geram os glóbulos sangüíneos durante a hemocitopoese

	Fatores de crescimento que levam a:	
Fatores ecológicos	Proliferação celular (mitogênicos)	Diferenciação celular
Presença de ambiente com célula e matriz extracelular adequados. No caso de medula óssea, a presença de células (reticulares, macrófagos e endoteliais) e componentes da matriz extramedular (laminina, colágeno e fibronectina) são importantes	Estes fatores agem basicamente de duas maneiras: a) induzindo células na fase G0 (de repouso) a iniciarem o ciclo mitótico; e b) promovendo a passagem de G1 para a fase S (síntese). Ao longo da seqüência de mitoses programadas, estas células vão adquirindo uma série de receptores de membrana que as tornam sensíveis aos fatores que agem na diferenciação	Os fatores de crescimento induzem uma série de modificações morfofuncionais que culminam na produção de uma célula madura, com morfologia e funções características, e controlam a atividade funcional das células diferenciadas

resta aumentar de volume para acompanhar o desenvolvimento do corpo. Esta impressão é errônea. No recém-nascido, os vários setores do organismo se encontram em fases diferentes de desenvolvimento e completam a diferenciação em ritmo diferente. Por exemplo, no momento do nascimento, os rins e o fígado não estão completamente diferenciados. É esta a razão por que o rim do recém-nascido não responde ao hormônio antidiurético. Quanto ao fígado, mostra-se incapaz de metabolizar com eficiência a bilirrubina, aparecendo com freqüência icterícia no recém-nascido. É verdade que, logo após o nascimento, existe uma formação muito alta de bilirrubina, devido à redução brusca no número de hemácias no recém-nascido, e a icterícia do recém-nascido é causada pelos dois fatores combinados: imaturidade do fígado e excesso de bilirrubina.

O sistema nervoso se encontra longe de completamente desenvolvido no recém-nascido. Assim é que a sua mielinização, importante para o isolamento da "fiação" do sistema nervoso, é lenta, começando no quarto mês de vida intra-uterina e prolongando-se até o segundo ano após o nascimento. As conexões entre os neurônios são incompletas, ao nascer, e vão gradualmente se completando durante os primeiros anos.

As glândulas mamárias são um exemplo único de diferenciação, pois estacionam na fase inicial da diferenciação das glândulas exócrinas, isto é, na fase de formação de ductos.

Durante a gravidez, devido ao estímulo de diversos hormônios, o processo de diferenciação se reinicia, formando-se os ácinos, que passam a secretar após o parto. Depois da lactação, reverte-se o processo, voltando a glândula mamária a um estado semelhante ao que existia antes da gravidez (Fig. 11.6). Trata-se, pois, de uma glândula cuja diferenciação só se completa na gravidez e é reversível após a lactação.

As células possuem mecanismos de autodestruição pelo processo de apoptose

Para que a diferenciação leve à morfogênese de órgãos normais, é necessário que, ao lado da proliferação e diferenciação celulares, exista também a eliminação das células que não são mais necessárias. Mesmo no adulto, a destruição programada de certas células também é de grande importância funcional.

O feto humano tem os dedos inicialmente fundidos numa espécie de nadadeira e, posteriormente, as células localizadas entre os dedos morrem e são eliminadas, ficando a mão com os cinco dedos normais. No timo dos mamíferos adultos, formam-se as células T (linfócitos T) que atacam antígenos estranhos ao organismo, mas forma-se, também, grande quantidade de células T que atacam antígenos do próprio corpo. Estas células precisam ser eliminadas, porque causariam grande dano ao organismo se fossem lançadas na circulação sangüínea. A diferenciação das glândulas mamárias, já mencionada, também só é possível porque as células que se formaram durante a gravidez, e que não são mais necessárias após a fase de aleitamento do recém-nascido, se autodestroem, fazendo a glândula voltar ao estado que apresentava antes da gravidez. Mesmo durante cada ciclo menstrual, há proliferação de tecido da glândula mamária, que é removido antes do ciclo menstrual seguinte. A remoção da cauda dos girinos, à medida que eles se transformam em rãs ou sapos adultos, é outro exemplo bem conhecido de morte celular programada.

Em todos os casos mencionados, a morte celular acontece pelo processo denominado **apoptose**, caracterizado por uma compactação da célula inteira, incluindo o núcleo, que, junto com o citoplasma, também diminui de volume e, ao microscópio, aparece condensado e escuro. As organelas citoplasmáticas não apresentam grandes modificações iniciais. A cromatina do núcleo condensado (**núcleo picnótico**) é partida em fragmentos por uma endonuclease que ataca o DNA. Durante a apoptose, as células emitem brotamentos citoplasmáticos, que se destacam da superfície e são rapidamente fagocitados por macrófagos ou por outras células. Na apoptose, a superfície celular se modifica, tornando mais fácil e rápida a fagocitose. Os macrófagos que englobam células em apoptose não sintetizam as moléculas que participam do processo inflamatório. Mesmo que numerosas células entrem em apoptose simultaneamente, como acontece no timo humano, elas não causam inflamação. Ao contrário, as células que morrem por **necrose**, processo devido a substâncias tóxicas, microrganismos ou outras causas, promovem uma resposta inflamatória nos tecidos vizinhos. A necrose é um processo patológico, enquanto a apoptose é um processo normal. As células em necrose mostram-se "inchadas", com aumento de volume da célula inteira e, também, aumento do volume das organelas, bem como das cisternas do retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi. As células necróticas se rompem e lançam seu conteúdo no meio extracelular, produzindo a inflamação, ao contrário da apoptose, em que a célula se mantém com a membrana plasmática intacta e os brotamentos destacados do citoplasma, na apoptose, também são delimitados pela membrana celular. Portanto, na apoptose, o conteúdo intracelular não é lançado no meio extracelular.

Os mecanismos moleculares da apoptose ainda não são bem conhecidos, mas estão sendo estudados intensamente por diversos pesquisadores. Sabe-se que a falta de alguns hormônios e fatores de crescimento pode levar as células-alvo à apoptose. Por exemplo, a falta do hormônio masculino testosterona causa apoptose nas células da próstata. Muitas células mantidas em culturas sofrem apoptose quando privadas de certos fatores de crescimento. Por outro lado, já foram identificados genes que participam do processo. Por exemplo, a expressão do gene bcl-2 (um proto-oncogene existente nos mamíferos) inibe a apoptose. Parece que os genes relacionados com a apoptose também têm relação com o aparecimento de tumores malignos.

Alterações da diferenciação celular no câncer

Nas células dos tumores malignos, os genes se expressam de maneira anormalmente diversificada e instável. Por exemplo, no câncer da mama as células podem produzir, ou não produzir, substâncias que vão induzir, no conjuntivo adjacente, intensa síntese de colágeno ou elastina.

Os cânceres (adenocarcinomas) do tubo digestivo, por sua vez, podem apresentar expressão de intensa síntese de muco ou nenhuma síntese, existindo um gradiente entre esses dois extremos. Essa instabilidade gênica explica as freqüentes transformações nos tumores, que levam a modificações na sua biologia e patologia. Explica também como é que tumores de origem epitelial podem gerar porções tumorais epiteliais que, ao longo de sua evolução, podem transformar-se gradualmente em células do conjuntivo, chegando a gerar tecido cartilaginoso e até ósseo, um exemplo único e extremo de modulação.

Vários tumores apresentam genes ativados que não são expressos, normalmente, nos tecidos adultos de onde se origina-

ram. As proteínas derivadas da expressão desses genes são chamadas de **marcadores tumorais**, e a detecção e a dosagem dessas proteínas são usadas na prática médica para o diagnóstico e para acompanhar a evolução dos tumores.

Sumário

Neste capítulo, foram estudadas as etapas básicas comuns à diferenciação das diversas células dos organismos pluricelulares. As células embrionárias iniciais geralmente são totipotentes, ou seja, têm a capacidade intrínseca de se transformarem nos vários tipos de células especializadas do corpo. A fixação do destino das células embrionárias ocorre no início dos processos morfogenéticos (blástula/gástrula) e envolve processos seqüenciais pelos quais as células embrionárias adquirem a capacidade de seguir diferentes rotas de desenvolvimento.

A diferenciação é controlada por fatores presentes na célula que se diferencia (fatores intrínsecos) *ou fora delas* (fatores extrínsecos). *Os fatores intrínsecos são devidos a uma programação gênica preestabelecida pela qual os genes vão-se expressando ou reprimindo em seqüência predeterminada ou, então, devidos a uma distribuição irregular de determinadas substâncias no citoplasma do ovo, substâncias essas que se distribuem heterogeneamente nos blastômeros, agindo sobre a seqüência de suas expressões gênicas.*

Os fatores extrínsecos podem ser subdivididos em fatores locais e ambientais. Os locais são resultantes de mensageiros químicos originados de outras células (hormônios, fatores de crescimento) ou da matriz extracelular do organismo em desenvolvimento. Os fatores de origem ambiental que afetam a diferenciação podem ser de natureza variada, e entre eles podem ser citadas a ação de drogas (incluindo remédios), as radiações ionizantes (raios X, radioatividade, raios UV etc.) e infecções virais.

Um modelo de diferenciação bem estudado e de interesse e aplicação médica é a formação de glóbulos sangüíneos (hemocitopoese).

Vários tecidos e órgãos do corpo humano não se apresentam completamente diferenciados no recém-nascido, e esse processo se completa em ritmo próprio em cada caso.

Bibliografia

ALBERTS, B. *et al. Molecular Biology of the Cell.* 3rd. ed. Garland Press, 1994.

BRACHET, J. and ALEXANDRE, H. *Introduction to Molecular Embryology*, 2nd ed. Springer-Verlag, Heidelberg, 1986.

BULLOUGH, W. S. *Evolution of Differentiation.* Acad. Press, 1967.

CARLSON, B. M. *Human Embryology and Developmental Biology.* Mosby, 1994.

GEHRING, W. J. The molecular basis of development. *Sci. Am.*, *253*:136, 1985.

GILBERT, S. F. *Developmental Biology.* 4th. ed. Sinauer, 1994.

LEE, S. *et al.* Apoptosis and signal transduction: Clues to a molecular mechanism. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, *5*:286, 1993.

NOVAK, R. Moving development research into the clinic. *Science*, *266*:567, 1994.

WOLFE, S. L. *Introduction to Cell and Molecular Biology.* Wadsworth, 1995.

12

Biologia da Interação Célula-Matriz Extracelular

ROTEIRO

- *A matriz extracelular influencia a estrutura interna e a atividade das células.*
- *As células interagem constantemente com a matriz extracelular.*
- *A matriz é viscosa e constituída principalmente de colágeno, elastina, glicoproteínas, proteoglicanas e água.*
- *A fibronectina e a laminina são glicoproteínas com sítios (regiões) que se prendem simultaneamente às células e a componentes da matriz.*
- *Alterações pós-traducionais e mutações gênicas podem produzir colágenos modificados, responsáveis por doenças.*
- *O processo de degeneração das fibras elásticas que ocorre com a idade, o principal responsável pelo aparecimento de rugas na pele, é muito aumentado pelo excesso de luz solar.*

Os tecidos animais e vegetais não são constituídos apenas por células mas apresentam um espaço extracelular freqüentemente preenchido por um complexo de componentes fibrosos — a **matriz extracelular**, de importância fundamental para as funções dos tecidos. O estudo das interações das células com a matriz extracelular é relativamente recente e tem evoluído muito rapidamente graças ao isolamento das macromoléculas da matriz, a sua localização por métodos imuno-histoquímicos e a caracterização dos receptores celulares para componentes da matriz, técnicas essas freqüentemente associadas à cultura de células. Os primeiros dados experimentais que permitiram caracterizar melhor essa interação foram obtidos fazendo-se culturas de células em frascos que tinham sido forrados previamente com componentes da matriz. Isto foi feito inicialmente com colágeno e, posteriormente, com outros componentes isolados (fibronectinas, laminina, proteoglicanas), ou com várias combinações dessas macromoléculas. Verificou-se então que, de modo geral, as células crescem mais vigorosamente e assumem aspectos diferentes, quando na presença de certos componentes da matriz. Além disso, elas alteram o seu comportamento quanto à motilidade, adesividade aos frascos etc., modificando até a disposição intracelular dos componentes do seu citoesqueleto, conforme as macromoléculas da matriz que forram os frascos de cultura. Verificou-se, também, que os componentes da matriz potenciam os seus efeitos, existindo hoje, no comércio, misturas de elementos da matriz que permitem cultivar tipos celulares que não cresciam *in vitro*. Muito importante foi a constatação de que as células cultivadas em presença de matriz mantêm mais facilmente as características fisiológicas e bioquímicas presentes *in vivo* nos órgãos de origem.

A matriz extracelular é constituída por um complexo, em proporções variáveis, de inúmeras proteínas e polissacarídeos que se organizam formando uma rede, em parte responsável pela grande diversidade morfológica, funcional e patológica dos diversos tecidos. A quantidade de matriz é variável com o tipo de tecido, sendo

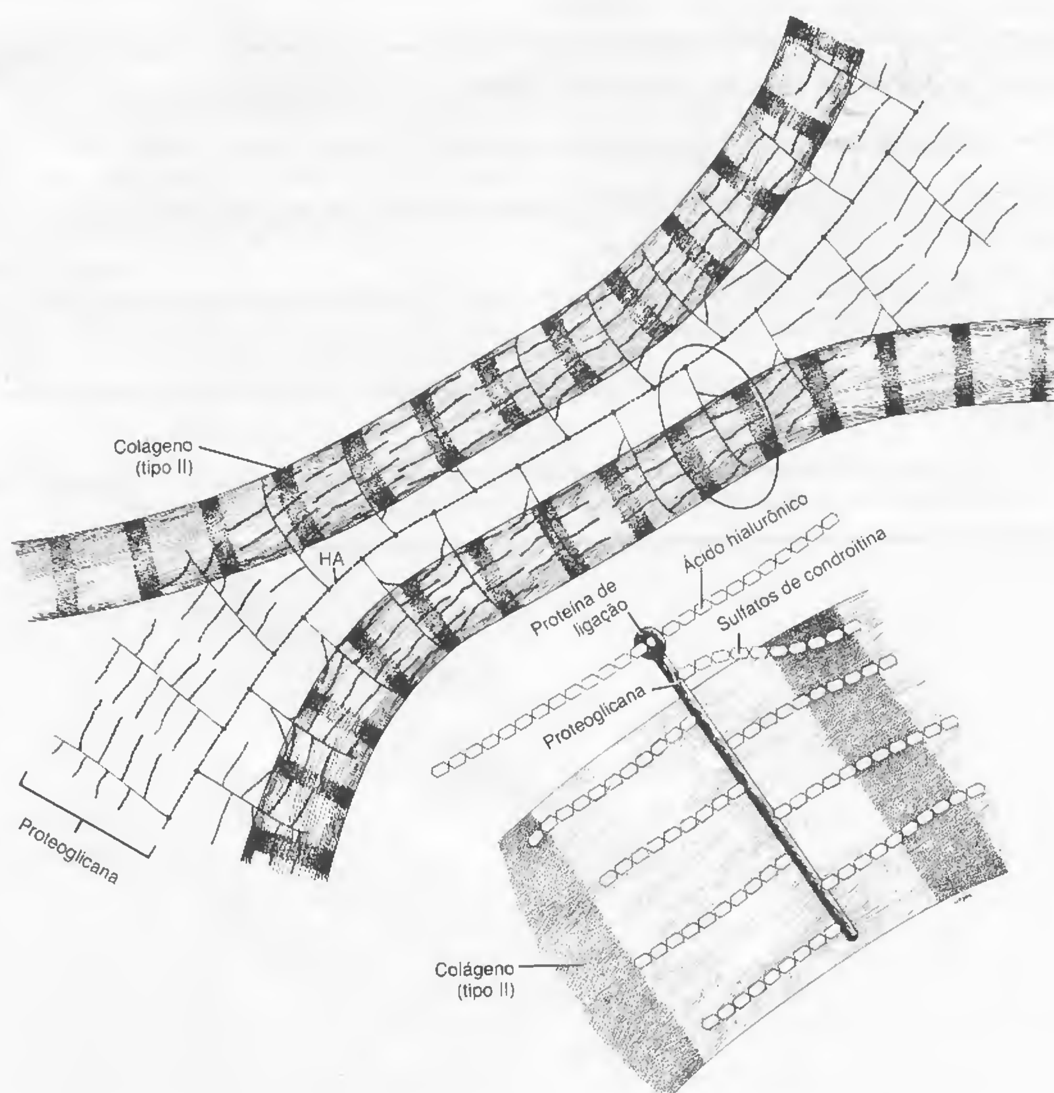


Fig. 12.1 Representação esquemática da organização molecular da matriz da cartilagem hialina. As proteínas de ligação unem por covalência a proteína central das proteoglicanas às moléculas do ácido hialurônico (HA). As cadeias de sulfatos de condroitina da proteoglicana estabelecem ligações eletrostáticas com as fibras colágenas, contribuindo para a rigidez da matriz. O desenho inferior é uma ampliação da área delimitada pelo oval no desenho superior, para mostrar melhor as interações dos diversos tipos de moléculas encontradas na matriz extracelular da cartilagem hialina.

abundante principalmente nos tecidos conjuntivos (cartilagem, osso, derme) e escassa no tecido nervoso e no epitelial. A matriz forma um substrato que fornece condições adequadas para o crescimento e diferenciação das células dos vários tecidos.

Os tecidos vegetais também apresentam matriz extracelular, que será estudada no Cap. 13.

Variações na qualidade e quantidade das células e da matriz, assim como o modo pelo qual se organizam, são responsáveis pela diversidade dos tecidos, como demonstram os exemplos a seguir enumerados. A deposição de cristais de fosfato de cálcio explica por que certos tecidos são duros, como os ossos e dentes, ao passo que outros apresentam um aspecto gelatinoso, ou são rígidos mas cedem às pressões, como as cartilagens. Há ainda tecidos, como os tendões, em que fibras de colágeno da matriz extracelular se dispõem como cordas altamente resistentes às tensões.

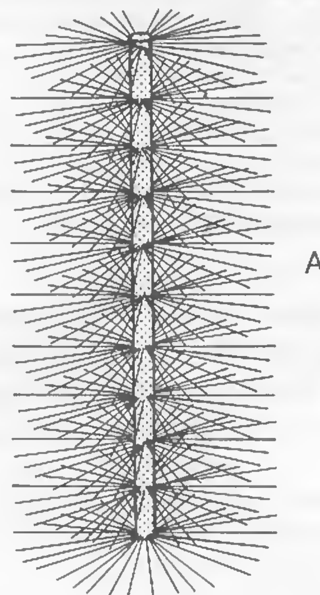
Na interface do tecido epitelial com o tecido conjuntivo, em torno das células musculares, dos capilares sangüíneos e dos capilares linfáticos, a matriz extracelular forma uma delgada camada, a **lâmina basal**, que é uma treliça de macromoléculas, importante para a função das células.

A matriz é constituída basicamente por proteínas fibrosas (colágeno e elastina) embebidas em um gel hidrofílico de polissacarídeos associados ou não a proteínas

Os múltiplos componentes da matriz são secretados, principalmente, por células do tecido conjuntivo e dividem-se em dois tipos: 1) aqueles constituídos por moléculas protéicas alongadas, que se agregam formando estruturas fibrilares ou fibrosas, como o **colágeno** e a **elastina**; e 2) os constituintes que se agregam mas não formam fibrilas ou fibras e, que por sua vez, podem ter dois subtipos, a saber: a) glicoproteínas (Fig. 12.2) alongadas, como **fibronectina** e **laminina**, cuja função principal é realizar a adesão entre a matriz e as células; e b) **glicosaminoglicanas** e **proteoglicanas**, que formam um gel hidratado no qual estão imersos os outros componentes da matriz. O colágeno e a elastina são responsáveis pelo arcabouço estrutural e elástico de vários tecidos. A fibronectina é responsável pela adesão das células não epiteliais à matriz, e a laminina, por sua vez, é responsável pela adesão das células epiteliais à lâmina basal. Já as glicosaminoglicanas e proteoglicanas formam um gel hidrófilo, semifluido, que permite a circulação, nos tecidos conjuntivos, de nutrientes, hormônios e outros mensageiros químicos. Nas cartilagens, as moléculas de glicosaminoglicanas e proteoglicanas formam um complexo de pontes moleculares unindo as fibrilas de colágeno entre si, emprestando a esse tecido a sua importante característica de rigidez e discreta compressibilidade.

Glicosaminoglicanas e proteoglicanas constituem famílias de compostos altamente hidrofílicos, com múltiplas funções

Glicosaminoglicanas são polímeros lineares (não-ramificados) de dissacarídeos, um dos quais tem sempre um radical amino, sendo o outro um ácido urônico. Constituem uma família complexa da qual o **ácido hialurônico**, o **dermatansulfato**, o **condroitinsulfato** e o **heparansulfato** são os principais componentes. Apresentam radicais carboxila (do ácido urônico) e, com exceção do ácido hialurônico, apresentam radicais sulfato. Conseqüentemente, são moléculas com carga negativa elevada. Esta situação atrai uma nuvem de cátions (principalmente sódio) que é osmoticamen-



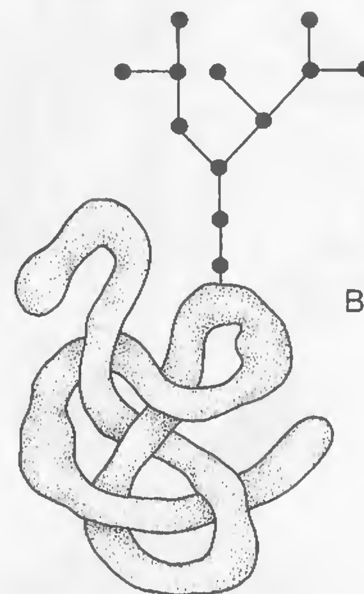


Fig. 12.2 Desenho ilustrando a estrutura molecular das proteoglicanas **(A)** e glicoproteínas **(B)**. As proteoglicanas são constituídas por cadeias retas de dímeros de glicosamina e ácido urônico (glicosaminoglicanas), que se inserem em uma proteína alongada, assumindo o aspecto de escova de mamadeira, onde o arame central é a proteína e as cerdas são as glicosaminoglicanas. Já as glicoproteínas apresentam-se constituídas por uma proteína globular à qual se associa cadeia ramificada constituída por monossacarídeos.

te ativa, atraindo água, o que explica a alta hidrofilia desses compostos, e a formação de um gel na matriz extracelular.

Admite-se que esse gel seja importante nos processos de desenvolvimento embrionário, regeneração dos tecidos, cicatrização e interação com o colágeno. Sabe-se, por exemplo, que os grupamentos ácidos desses compostos interagem com os radicais básicos do colágeno, contribuindo para a firmeza (turgor) da matriz extracelular (Fig. 12.1).

A matriz extracelular também é importante em patologia, pois a sua viscosidade retarda a penetração de microrganismo nos tecidos. Bactérias que produzem enzimas capazes de digerir macromoléculas da matriz extracelular se infiltram com mais facilidade nos tecidos. É o caso dos estafilococos que secretam hialuronidase e o do clostrídio (responsável pela gangrena) que secreta colagenase.

Com exceção do ácido hialurônico, as outras glicosaminoglicanas citadas se prendem por covalência a cadeias protéicas, formando as **proteoglicanas** (Fig. 12.2).

Fibronectina e laminina são glicoproteínas alongadas, adesivas e extracelulares contendo em suas moléculas sítios que as prendem a células e a componentes da matriz

A **fibronectina** representa uma família de mais de 20 glicoproteínas que contêm locais de adesão às células, a outras moléculas de fibronectina e a componentes fibrosos da matriz (Fig. 12.3). Servem, assim, de pontes de união entre as células e a matriz extracelular. Derivam de um único gene cujo RNA pré-mensageiro é processado de maneiras distintas, gerando mais de 20 mRNAs diferentes. A fibronectina não só é responsável pela ligação célula-matriz extracelular, mas demonstrou-se a sua importância no desenvolvimento embriológico. Por exemplo, durante a gastrulação de anfíbios, a fibronectina orienta a migração das células que vão gerar o mesoderma.

A **laminina** é uma molécula constituída por três polipeptídeos enovelados, em forma de cruz, que também apresenta porções que se ligam ao colágeno tipo IV, ao heparansulfato e a receptores celulares de laminina, formando assim pontes que ligam as células à matriz (Fig. 12.4). Como o colágeno IV e o heparansulfato são os principais componentes das lâminas basais (ver adiante). A laminina serve de ponte de ligação entre as células e essas lâminas.

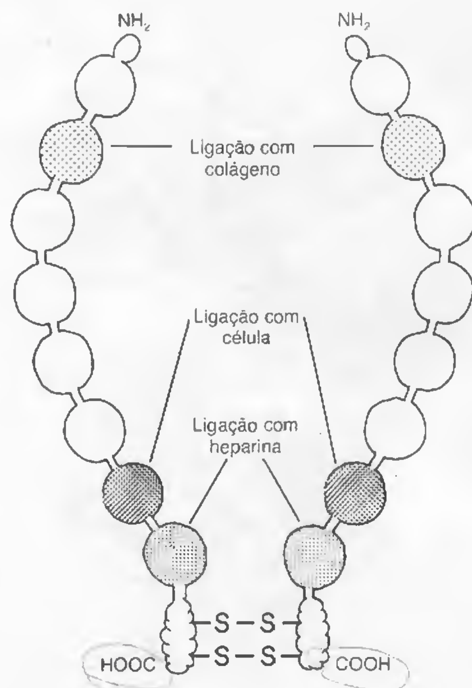


Fig. 12.3 Esquema ilustrando a estrutura da molécula de fibronectina constituída por duas cadeias polipeptídicas (dímero) unidas por grupamentos S–S. Cada cadeia apresenta-se constituída por porções enoveladas e por segmentos polipeptídicos flexíveis, que alternam com as porções arredondadas. Cada porção enovelada (arredondada) é especializada na adesão a determinadas macromoléculas, localizadas na superfície das células ou na matriz extracelular. Nesse desenho simplificado, estão indicadas as funções de apenas três dessas regiões.

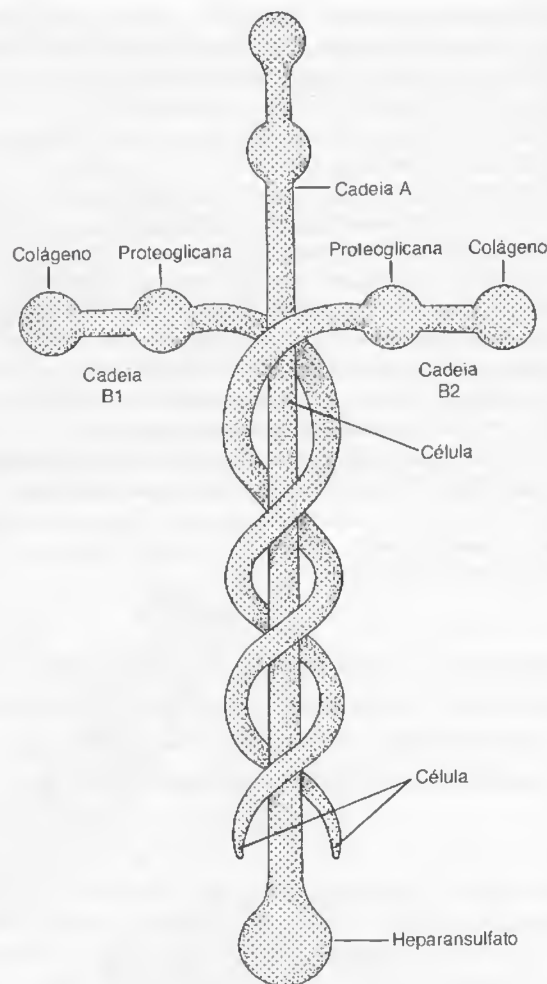


Fig. 12.4 Desenho esquemático da molécula de laminina, em forma de cruz, constituída por três polipeptídeos presos entre si por grupamentos S—S (não mostrados). Estão indicadas as regiões da molécula de laminina que aderem às células e às macromoléculas de matriz extracelular.

As integrinas constituem um complexo de receptores celulares que prendem as células à matriz

As células apresentam uma família de receptores, localizados nas membranas plasmáticas, que se ligam a vários componentes da matriz, entre os quais estão o colágeno e a laminina. Cada um desses receptores é constituído por duas moléculas de glicoproteínas alongadas que receberam o nome genérico de **integrinas**. As integrinas são proteínas transmembrana, com uma extremidade externa que se prende a componentes da matriz e uma extremidade citoplasmática que se liga, por intermédio da proteína **talina**, à porção do citoesqueleto constituída de actina (Fig. 12.5). Estabelece-se assim a comunicação da matriz extracelular com o citoplasma através da membrana plasmática, explicando a ação que a matriz exerce sobre o citoesqueleto (Figs. 12.6 e 12.7).

Existem integrinas também nas plaquetas sangüíneas, que se ligam à fibronectina e ao fibrinogênio, que podem estar presentes na matriz quando ocorre hemorragia.

Devido a essa associação entre plaquetas, fibrinogênio (componentes dos coágulos sangüíneos) e fibronectina é que os coágulos se prendem à matriz, processo importante no controle das hemorragias.

Já foi descoberta a ausência de determinadas integrinas, devido a mutação genética, o que gera certas doenças. Por exemplo, **na doença de Glanzmann**, a ausência do receptor celular para o fibrinogênio leva a hemorragias freqüentes. A doença chamada de **deficiência do fator de adesão de leucócitos** é gerada pela ausência de uma das cadeias polipeptídicas da integrina dos leucócitos, levando a repetidas infecções bacterianas nos pacientes. O defeito na integrina dos leucócitos dificulta os movimentos dessas células defensivas, prejudicando sua capacidade de migrar para os locais de infecção e fagocitar os microrganismos invasores.

A lâmina basal tem papel relevante na biologia e patologia dos tecidos

A lâmina basal (Figs. 12.8, 12.9 e 12.10) é uma treliça de moléculas de colágeno tipo IV embebida em inúmeras (mais de 30) proteínas, das quais as mais importantes são a **laminina** e a **proteoglicana do heparansulfato**.

As moléculas de colágeno, nas lâminas basais, não se dispõem paralelamente em fibrilas, associando-se porém com o aspecto de uma tela de galinheiro, apresentando laminina e proteoglicanas entre suas malhas. Esta estrutura forma, pois, uma malha filtrante de carga aniônica, devido ao heparansulfato que contém. Serve, portanto, de filtro aniônico, característica importante para a filtração do plasma sangüíneo e formação da urina nos rins. No pulmão, a lâmina basal protege este órgão contra a penetração nos tecidos de material transportado pelo ar inspirado. Os componentes da lâmina basal são produzidos pelas células epiteliais, endoteliais e musculares, e não por células do tecido conjuntivo.

Para se propagarem no organismo, as células dos tumores malignos de origem epitelial devem atravessar as lâminas basais dos epitélios (Fig. 12.11) e as lâminas basais dos capilares, para caírem na corrente sangüínea ou linfática. Atravessam novamente a lâmina basal, para saírem em direção oposta e formar colônias de células malignas ou **metástases** (do grego *meta*, longe, e *stasis*, parada) nos vários órgãos.

Os mecanismos pelos quais células de defesa, como os leucócitos, aderem ao endotélio, atravessam os capilares, e se movimentam nos tecidos, são de grande importância para a compreensão dos processos inflamatórios. Esses movimentos dependem, principalmente, dos receptores que possibilitam o reconhecimento entre as células, e da presença de substâncias químicas que atraem as células para a proximidade dos agentes agressores, fenômeno denominado de **quimiotactismo**.

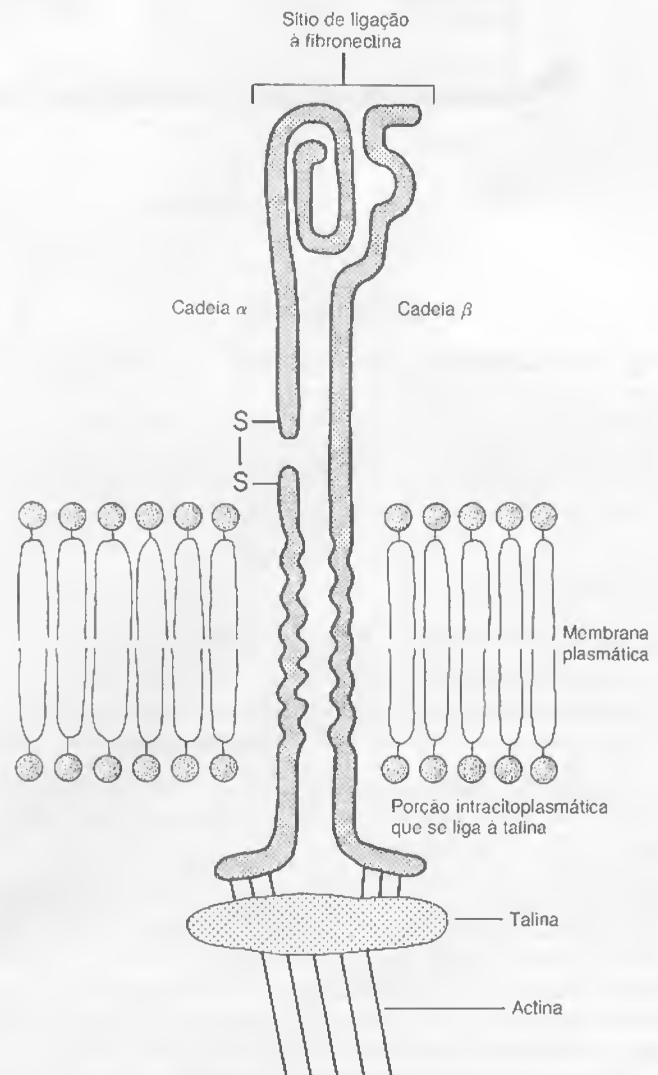


Fig. 12.5 Desenho esquemático do receptor de fibronectina (uma integrina), mostrando que se trata de uma proteína transmembrana que se prende à fibronectina na região extracelular e, no citoplasma, por intermédio da talina, prende-se à actina. A mutação genética que leva à ausência da cadeia polipeptídica β é responsável pela deficiência do fator de adesão dos leucócitos, levando a infecções recorrentes nos pacientes com este defeito genético. A suscetibilidade a infecções é conseqüência da incapacidade dos leucócitos, células de defesa, de se locomoverem, pois seus movimentos dependem de ligações temporárias com macromoléculas da matriz extracelular do tecido conjuntivo.

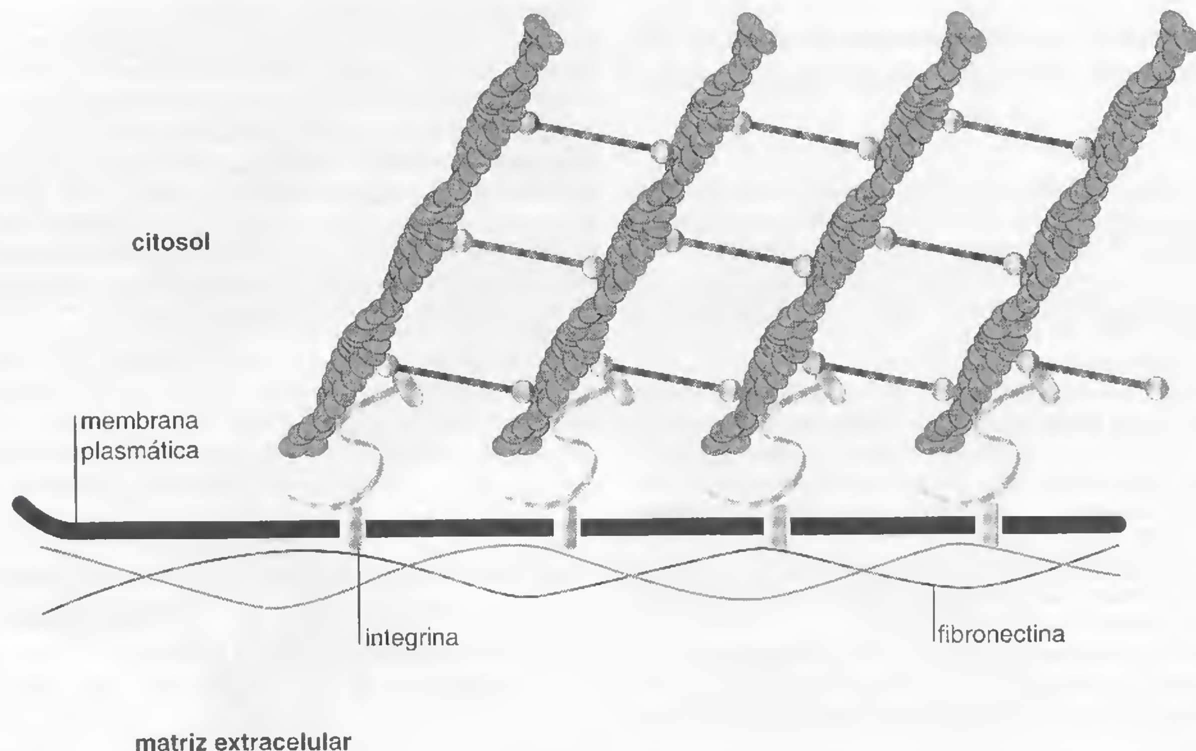


Fig. 12.6 Desenho esquemático mostrando a inserção de microfilamentos do citoesqueleto em receptores da membrana que, por sua vez, interagem com as células vizinhas (não mostradas no desenho) e com macromoléculas da matriz extracelular. Assim, existe uma continuidade entre moléculas intracelulares e moléculas extracelulares, formando fibronexos. Observe que pontes (α-actinina) entre microfibrilas de actina vizinhas criam um conjunto de moléculas de actina em contato com área apreciável da membrana plasmática, gerando forças suficientes para promover a adesão das células entre si ou com a matriz extracelular.

Os componentes fibrilares e fibrosos (colágenos e elastina) da matriz desempenham funções várias nos tecidos

O **colágeno** constitui uma família de proteínas alongadas que compreende mais de uma dúzia de tipos, dos quais quatro são os mais conhecidos. Trata-se de proteínas características dos metazoários, que apareceram e se diversificaram precocemente durante a evolução, a ponto de existirem já três tipos diferentes nos espongiários. Admite-se que os colágenos se desenvolveram a partir de uma proteína inicial, que foi-se diversificando, assumindo estruturas, funções e reações diferentes, de acordo com as necessidades de cada tecido. É a proteína mais abundante no organismo humano, onde constitui 25% do total das proteínas do corpo.

Neste capítulo serão analisadas, sucintamente, as características dos quatro tipos mais conhecidos, que foram rotulados de I a IV. As moléculas de colágeno são constituídas por três polipeptídeos dispostos em tripla hélice (Fig. 12.12), de aproximadamente 1.000 aminoácidos cada polipeptídeo.

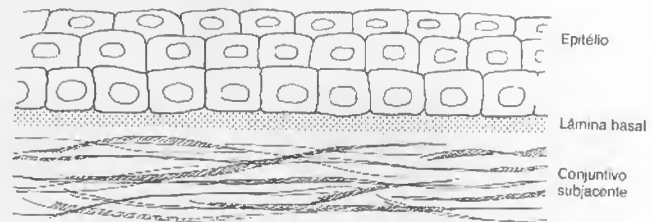
Essas triplas hélices podem associar-se entre si, formando estruturas com graus crescentes de polimerização. Assim é que, no colágeno tipo IV, as moléculas se associam pelas extremidades formando uma rede com aspecto de tela de galinheiro. Nos colágenos tipo I, II e III, as moléculas se associam paralelamente formando **fibrilas** visíveis só ao microscópico eletrônico, com o diâmetro oscilando entre 20 e 300 nm. No colágeno tipo II, a polimerização estaciona na fase de fibrila, como se observa nas cartilagens. Nos colágenos I e III, o processo de polimerização se acentua, e, no colágeno tipo III, essas fibrilas se agrupam formando delgadas fibras chamadas de **fibras reticulares do conjuntivo**, visíveis ao microscópio óptico com 1 a 4 μm de diâmetro. No colágeno tipo I, o processo vai mais adiante e as fibras são mais espessas e freqüentemente se associam, formando **feixes de fibras** com até 20 μm de diâmetro, constituindo o que normalmente se chama de **fibras de colágeno do tecido conjuntivo** (Fig. 12.13).

O colágeno tipo II é característico das cartilagens e se associa intimamente com proteoglicanas contendo condroitinsulfato, as quais lhe emprestam uma característica de compressibilidade reversível devido à alta hidrofilia que apresentam. Funciona pois, grosseiramente comparando, como uma esponja que perde água quando comprimida e se embebe novamente em água voltando à forma inicial, quando a pressão é retirada. Faz, portanto, o papel de uma mola de natureza físico-química que funciona sem gasto de energia, característica esta importante para as cartilagens das articulações sujeitas a pressões.

O colágeno III é encontrado em tecidos que alteram seu volume e forma com freqüência, como nas artérias, músculo liso do tubo digestivo, útero etc. Nesse tipo de colágeno ocorrem, com freqüência, pontes de proteoglicanas entre as fibrilas de colágeno, emprestando às fibras reticulares características de elasticidade limitada, porém importante para estes órgãos.



Fig. 12.7 Desenho ampliando uma parte da Fig. 12.6 para mostrar os componentes do fibronexo. O microfilamento de actina prende-se às proteínas vinculina e talina. Esta última liga-se a uma integrina da membrana celular, que se prende à fibronectina da matriz extracelular. A molécula de α-actinina prende os microfilamentos de actina uns aos outros, criando um edifício molecular mais firme.



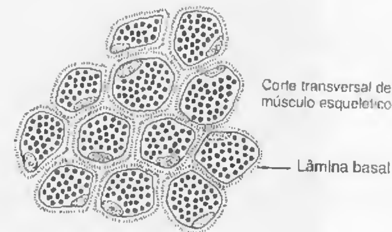




Fig. 12.8 Desenho esquemático ilustrando a presença de lâmina basal separando os epitélios do tecido conjuntivo subjacente. As células musculares e os capilares sangüíneos e linfáticos também são separados do tecido conjuntivo por intermédio de lâminas basais.

O colágeno tipo I, presente na derme, aponeuroses, ossos e tendões, apresenta múltiplas e fortes ligações covalentes entre suas fibrilas. Essas ligações cruzadas atingem o seu grau máximo nos tendões. O colágeno tipo I é bem adaptado principalmente para resistir às tensões. A Tabela 12.1 mostra as principais características desses quatro tipos de colágeno.

Os colágenos são proteínas que sofrem inúmeras alterações pós-traducionais, que se processam principalmente dentro das cisternas do retículo endoplasmático rugoso e, também, no meio extracelular. Conseqüentemente, a sua síntese é mais complexa do que a da maioria das proteínas, o que explica o elevado número de doenças resultantes da síntese defeituosa do colágeno.

Muitas das doenças do colágeno são devidas a alterações gênicas e provocam afrouxamento dos tendões, ligamentos e pele. Esses sintomas podem ser causados por várias alterações da sín-

Tabela 12.1 Características dos 4 tipos principais do colágeno

Tipo	Distribuição	Células produtoras	Grau de polimerização	Função
I	Derma, tendão, osso, pigmentos (fibras de colágeno)	Fibroblastos	*Máxima* — fibras e feixe de fibras	Resistir à tensão
II	Cartilagens	Condrócitos	*Pequena* — só forma fibrilas	Resistir à pressão
III	Músculo liso, órgão hemopoético, nervos (fibras reticulares)	Músculo liso, células reticulares	*Média* — só forma fibras finas	Resistir à tensão com a elasticidade
IV	Lâminas basais	Células epiteliais, endoteliais, musculares	*Nenhuma* — as moléculas se associam formando uma malha submicroscópica	Suporte, filtração, barreira

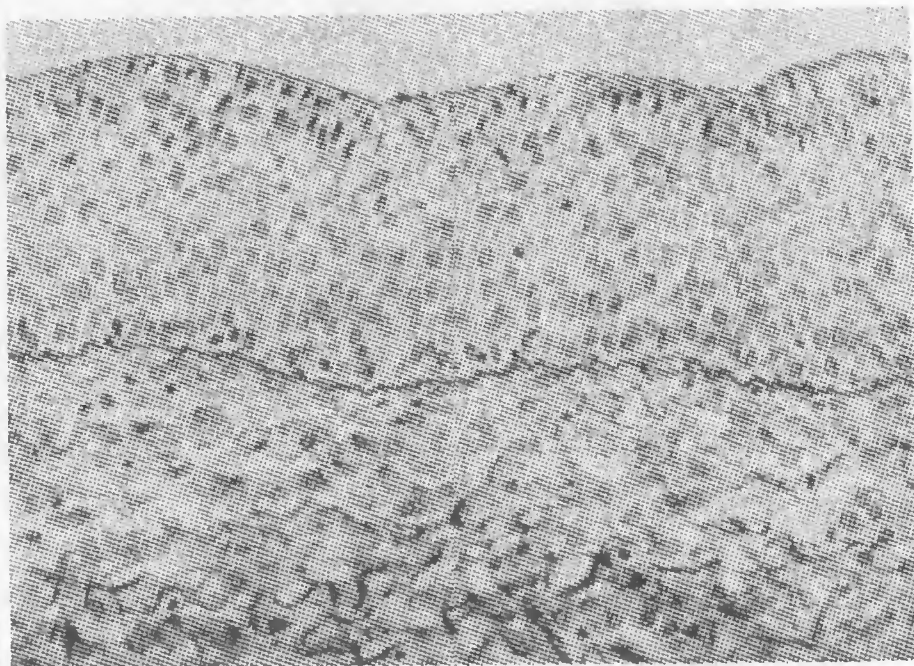


Fig. 12.9 Fotomicrografia de epitélio estratificado mostrando a lâmina basal que o separa do tecido conjuntivo subjacente.

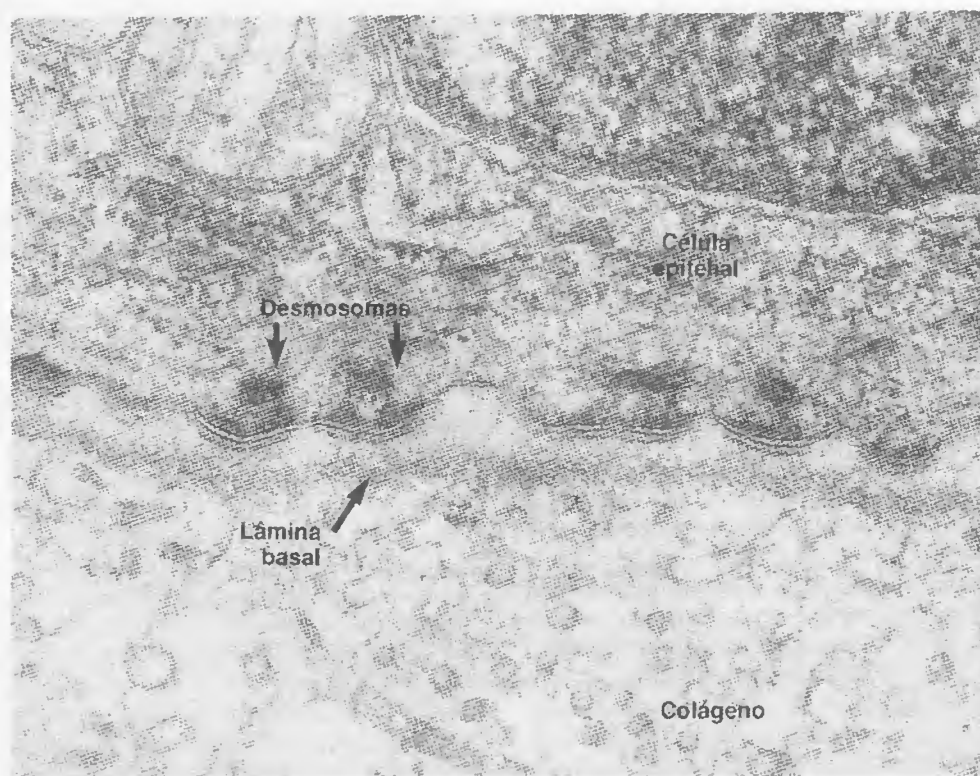


Fig. 12.10 Eletromicrografia da interface de uma célula epitelial da pele com o tecido conjuntivo subjacente. Entre essas duas estruturas, apresenta-se a lâmina basal. Observe os **hemidesmosomas** que se prendem à lâmina basal por meio de filamentos intermediários.

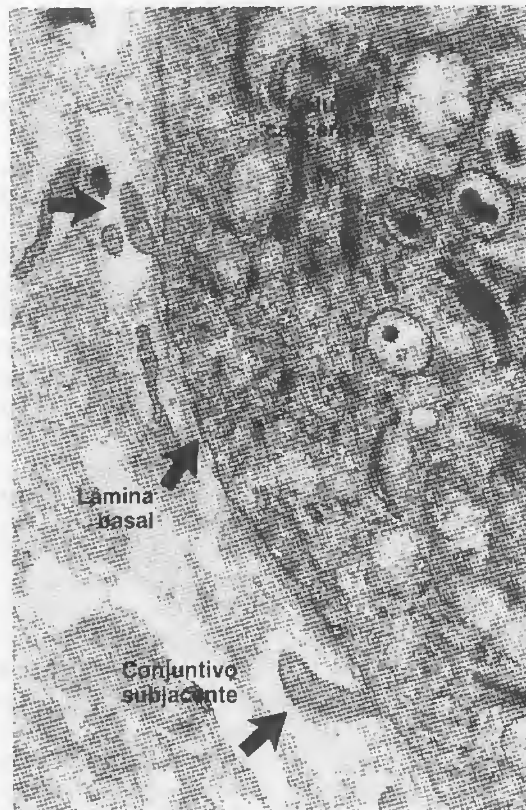


Fig. 12.11 Eletromicrografia da interface de uma célula cancerosa (carcinoma espinocelular) com o tecido conjuntivo subjacente. Observe extensões celulares atravessando a lâmina basal (**setas**), iniciando assim a invasão do tecido conjuntivo. Essa capacidade invasiva é característica dos tumores malignos.

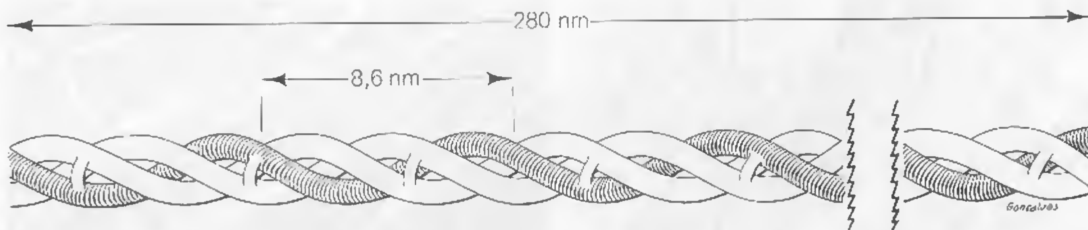


Fig. 12.12 Desenho ilustrando a constituição da molécula de colágeno formada por 3 cadeias polipeptídicas enroladas em espiral.

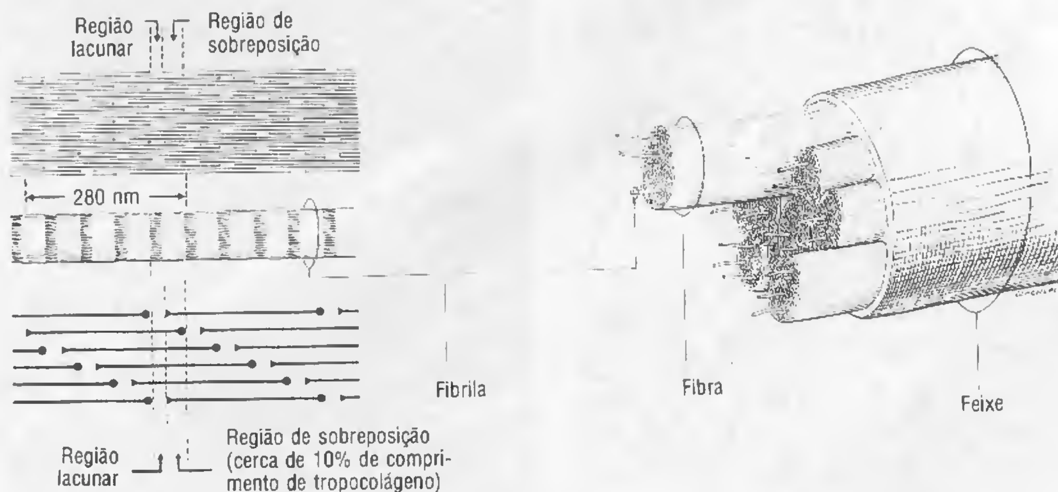


Fig. 12.13 Desenho esquemático do processo de polimerização gradual do colágeno nas **fibras de colágeno,** constituídas por colágeno tipo I. As moléculas de colágeno (tropocolágeno) se associam paralelamente, formando fibrilas que aparecem com estrias transversais ao microscópio eletrônico. Inúmeras fibrilas se agrupam formando uma fibra, e várias fibras constituem um feixe. As moléculas de colágeno tipo IV não se associam paralelamente. O colágeno tipo II forma **fibrilas** apenas. No colágeno tipo III, as **fibrilas** se associam formando **fibras**. O colágeno do tipo I é o único que produz **fibras** e **feixes de fibras**.

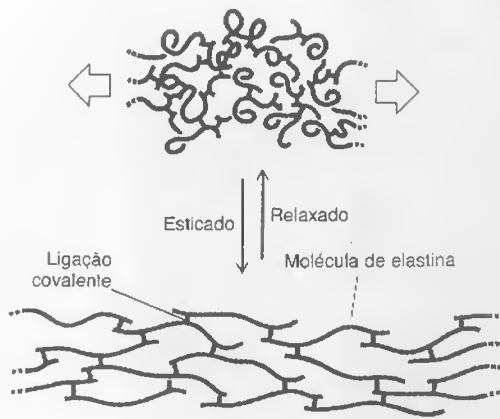


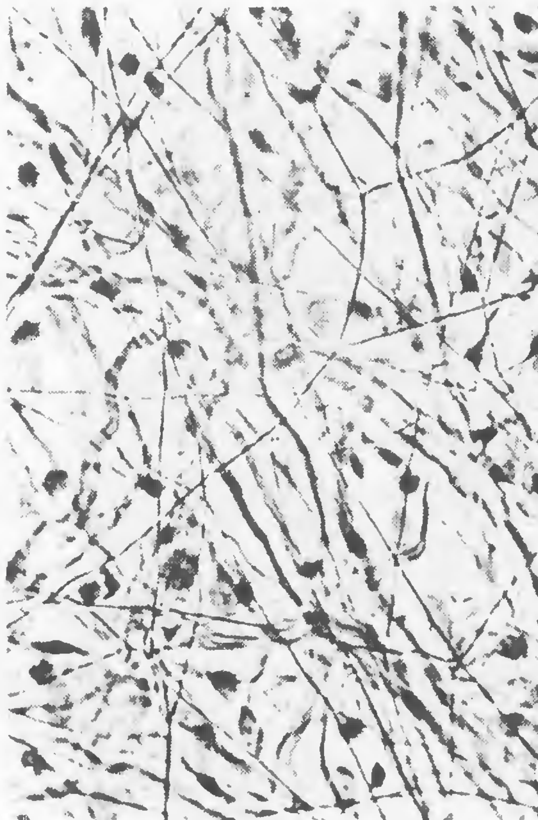
Fig. 12.14 Desenho ilustrando o modelo mais aceito para explicar a elasticidade das fibras elásticas. As moléculas de elastina, parcialmente enoveladas, se prendem por suas extremidades através de ligações covalentes. Quando as fibras são esticadas, as moléculas de elastina se desenrolam, voltando à posição inicial uma vez terminada a força exercida.

tese do colágeno e foram agrupados nas síndromes (conjunto de doenças com sintomas comuns) de Ehlers-Danlos, da qual existem oito variedades clínicas conhecidas, onde se incluem os contorcionistas de circo.

Enfraquecimento do colágeno dos vasos sangüíneos e dos ligamentos dentários causa hemorragias freqüentes e queda dos dentes, sintomas característicos do escorbuto, doença causada pela carência de vitamina C, co-fator indispensável para síntese de colágeno.

As **fibras elásticas** são abundantes em estruturas como a pele, artérias e pulmões, o que facilita a movimentação constante desses órgãos que requerem elasticidade além de resistência às tensões. As fibras elásticas apresentam a capacidade de se distenderem quando tracionadas, voltando logo depois ao seu comprimento normal. A elasticidade das fibras elásticas é, no mínimo, cinco vezes maior do que a de um filamento de borracha do mesmo diâmetro. Elas são constituídas essencialmente por uma glicoproteína (elastina) altamente hidrofóbica cujas moléculas parcialmente enoveladas se prendem entre si por ligações covalentes entre suas extremidades (Fig. 12.14). A elastina se agrega formando fibras, que se anastomosam para constituir uma rede (Fig. 12.15), como na pele e no pulmão. Na parede das grandes artérias, a elastina se dispõe em lamelas, paralelas umas às outras.

Ao lado da elastina, que aparece amorfa nas micrografias eletrônicas, as fibras elásticas apresentam ainda uma quantidade variável de estruturas tubulares, os **fibrotúbulos**, visíveis no mi-



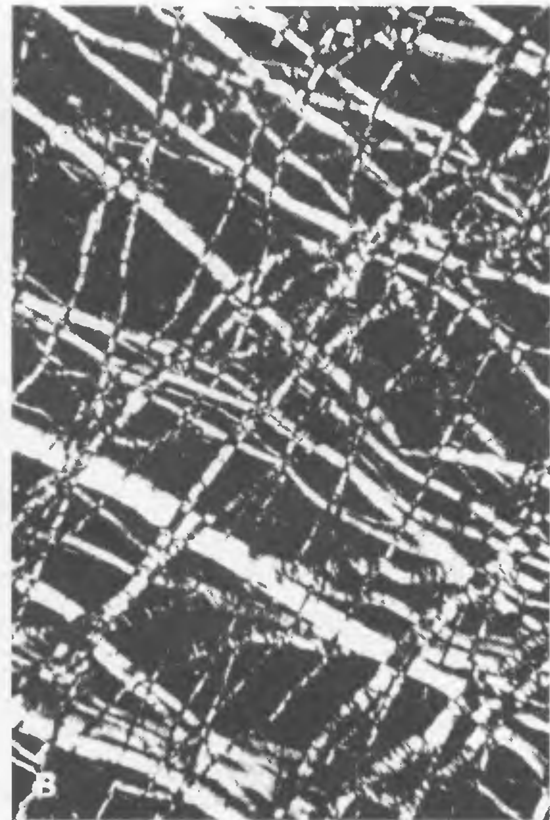


Fig. 12.15 Fotomicrografias mostrando fibras colágenas e elásticas. Na fotomicrografia da **esquerda**, observe que as fibras elásticas são finas, regulares e se anastomosam, ao passo que as colágenas são irregulares e não se anastomosam. A fotomicrografia da **direita**, feita com microscopia de polarização, mostra as fibras de colágeno claras, contra um fundo escuro. Isto se deve à birrefringência das fibras colágenas, conseqüência da orientação paralela das moléculas de colágeno, que desviam o plano da luz polarizada. 300 ×.

croscópio eletrônico. Os fibrotúbulos são constituídos por uma proteína diferente da elastina.

As fibras elásticas da pele tendem a degenerar com a idade, sendo parcialmente responsáveis pelas rugas, processo este muito acelerado pela exposição excessiva à luz solar (elastose solar).

Sumário

Os tecidos dos animais e vegetais são constituídos por células e por material extracelular produzido pelas células. Este material recebe o nome de matriz extracelular.

Através de moléculas protéicas integrais da membrana plasmática, estabelece-se continuidade entre o interior da célula e a matriz extracelular. Moléculas do citoesqueleto se prendem a proteínas da membrana, que são receptores para macromoléculas da matriz extracelular, estabelecendo uma conexão entre o citoesqueleto e a matriz extracelular.

Um componente importante da matriz é a lâmina basal, que se dispõe entre os tecidos epiteliais, células musculares, capilares sangüíneos e linfáticos, e o tecido conjuntivo.

A matriz tem significado funcional muito amplo nos tecidos, participando da manutenção da estrutura, do desenvolvimento embriológico e pós-natal, da proliferação celular, da regeneração, da nutrição e de processos patológicos.

Os componentes fibrilares da matriz são os diversos tipos de colágeno *e* as fibras elásticas. *Os principais componentes não-fibrilares são as* glicoproteínas fibronectina *e* laminina, *e as* glicosaminoglicanas, *que geralmente estão associadas a proteínas, formando as* proteoglicanas.

Bibliografia

BUCK, C. A. and HORWITZ, A. F. Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. *Ann. Rev. Cell. Biol.*, *3*:179, 1987.

BUGERSON, R. E. New collagens, new concepts. *Ann. Rev. Cell. Biol.*, *4*:551, 1988.

EVERED, D. and WHELAN, J. eds. *Functions of Proteoglycans*. Ciba Fountation Symposium 124. John Wiley, 1986.

HAY, E. D. ed. *Cell Biology of Extracellular Matrix*. 2nd ed. Plenum, 1991.

HYNES, R. O. Fibronectins. *Sci. Am.*, *254*(6):42, 1986.

HORWITZ, A. F. and THIERY, J. P. (eds.). Cell-to-Cell contact and extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, *6*:645, 1994.

KJELLEN, L. and LINDAHL, U. Proteoglycans: Structure and interactions. *Ann. Rev. Biochem.*, *60*:443, 1991.

KUCHARZ, E. J. *The Collagens. Biochemistry and Pathology*. Springer-Verlag, 1992.

McDONALD, J. A. and MEECHAM, R. P. (eds.). *Receptors for Extracellular Matrix*. Acad. Press, 1991.

RUOSLAHTI, E. Structure and biology or proteoglycans. *Ann. Rev. Cell. Biol.*, *4*:229, 1988.

WIGHT, T. N. and MEECHAM, R. P. eds. *Biology of Proteoglycans*. Acad. Press, 1987.

13 A Célula Vegetal

Roteiro

- *As células dos vegetais são eucariontes e assemelham-se às células animais em muitos processos moleculares básicos, como replicação do DNA, transcrição e síntese de proteínas.*
- *A fotossíntese e a presença de uma parede rígida, são as principais características das células vegetais.*
- *As células vegetais apresentam um vacúolo que ocupa 5 a 95% do volume celular.*
- *O vacúolo pode servir de depósito de substâncias, como, por exemplo, látex, ópio e proteínas.*
- *Outra função do vacúolo é manter o turgor da célula vegetal.*
- *Os plastos só existem nas células vegetais e possuem genoma próprio como as mitocôndrias; os cloroplastos executam a fotossíntese.*
- *As células vegetais não têm centríolos.*

As células vegetais assemelham-se às animais em inúmeros mecanismos moleculares básicos, como a replicação do DNA, sua transcrição em RNA, síntese protéica, transformação de energia via mitocôndrias e estrutura molecular das membranas e das várias organelas. Diferem, porém, devido a uma diversificação evolutiva caracterizada por dois eventos básicos: 1) a presença de uma parede celular rígida; e 2) a fotossíntese, que lhes permite sintetizar compostos orgânicos, utilizando CO_2 e a energia da luz solar.

A parede das células vegetais é um tipo de matriz extracelular rígido

Como os tecidos animais, os tecidos vegetais também apresentam um tipo especializado de **matriz extracelular**, que forma uma estrutura espessa, rígida e forte, envolvendo as células. Essa estrutura, a **parede celular** (Figs. 13.1 e 13.2), tira a mobilidade das células dos vegetais, e é responsável pelas características especiais de crescimento, nutrição, reprodução e defesa presentes nos vegetais. As paredes das células vizinhas prendem-se umas às outras para formar os vários tecidos vegetais. São as paredes celulares que dão sustentação à planta e, em última instância, definem a forma da própria planta.

Nas plantas, as células geralmente se formam em tecidos especiais, denominados meristemas. As células recém-constituídas são pequenas, em comparação com o tamanho que assumirão quando completamente desenvolvidas. Suas paredes, por serem delgadas e semi-rígidas, possibilitam o crescimento das células. Essas são as **paredes primárias**. Depois de cessado o crescimento celular, a parede não mais necessita expandir-se e, na grande maioria dos casos, surge uma nova parede, denominada **parede secundária**, que se forma, ou por um simples espessamento da parede primária, ou pela deposição de novas camadas, de composição química diferente, entre a parede primária e a membrana plasmática.

A parede celular é constituída por fibrilas de celulose embebidas em polissacarídeos e proteínas

A parede das células vegetais, cuja espessura varia de 0,1 a vários micrômetros, é formada por **fibrilas de celulose** embebidas em um material hidrofílico, a **matriz**, constituído essencialmente por **hemicelulose**, **pectina** e **proteínas**, em proporções variáveis, de acordo com a fase de crescimento da planta e o tecido vegetal analisado. A celulose é um polímero da glicose, porém com um arranjo molecular que lhe confere insolubilidade e grande resistência às forças de tração. Na parede celular, a celulose forma fibrilas, sendo cada fibrila constituída por um feixe de moléculas de celulose orientadas paralelamente umas às outras e interligadas por pontes de hidrogênio. Na parede, as fibrilas de celulose formam camadas, com as fibrilas de cada camada dispostas perpendicularmente

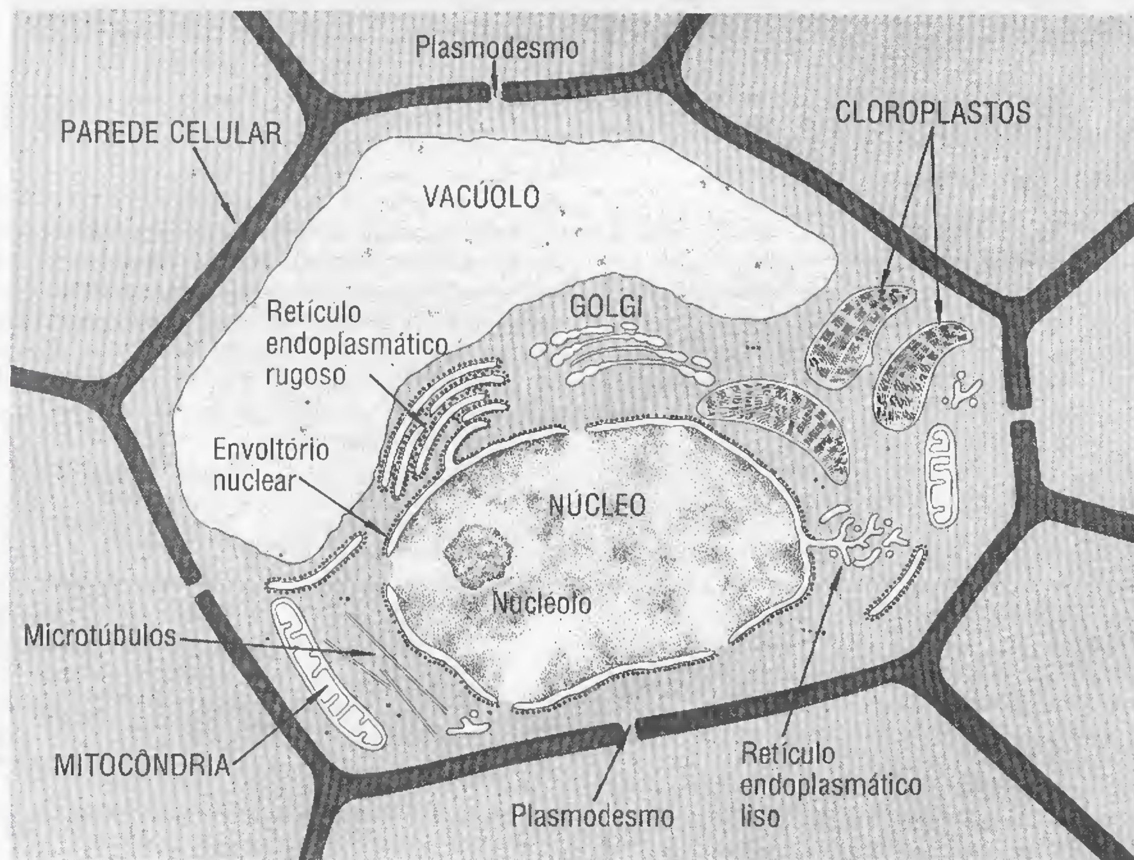


Fig. 13.1 Desenho esquemático da estrutura de uma célula vegetal, caracterizada pela presença de parede celular, plasmodesmos e cloroplastos. O vacúolo, único ou múltiplo, pode ocupar até 95% do volume citoplasmático.



Fig. 13.2 Eletromicrografia de corte de folha de chuchu (*Sechium edule L.*). Observar os núcleos, cloroplastos, vacúolos, mitocôndrias e parede celular. 7.000 ×. Cortesia de E. W. Kitajima.

às fibrilas das camadas adjacentes. A Fig. 13.3 dá uma noção da disposição dessas moléculas em uma parede celular primária. Observe que os compostos altamente hidrofílicos (pectina, proteína e hemicelulose) servem de ponte de associação entre as fibrilas de celulose, formando uma rede tridimensional hidrofílica, responsável pela permeabilidade da parede celular, que permite, em maior ou menor intensidade, a troca de nutrientes, catabólitos e sinais químicos, entre as células e o meio extracelular.

As **pectinas** são polissacarídeos complexos, altamente ramificados e hidrófilos, ricos em ácido galacturônico. As pectinas formam um gel hidratado que preenche o espaço entre as camadas fibrosas de celulose. Esse gel constitui uma barreira que determina o tamanho das moléculas que podem atravessar a parede primária e atingir as células. Assim, o gel de pectinas desempenha importante papel funcional, possibilitando a passagem de íons e moléculas pequenas. As pectinas têm utilidade comercial por terem consistência gelatinosa, sendo usadas na fabricação de doces e geléias.

A **hemicelulose** é um polímero da celulose em que a maior parte dos resíduos de glicose contêm cadeias laterais compostas por outros hidratos de carbono, principalmente xilose. As moléculas de hemicelulose se ligam fortemente às fibrilas de celulose, constituindo uma rede estrutural muito complexa.

As **proteínas estruturais** da matriz da parede das células vegetais são, principalmente, proteínas ricas em prolina, hidroxiprolina e glicina. Têm importante papel na organização da arquitetura dessas paredes.

Graças à alta hidrofilia da matriz da parede celular, que pode conter em células jovens até 60% de água, moléculas pequenas como íons, água e sacarose passam livremente pela parede. Todavia, a parede constitui uma barreira para moléculas acima de

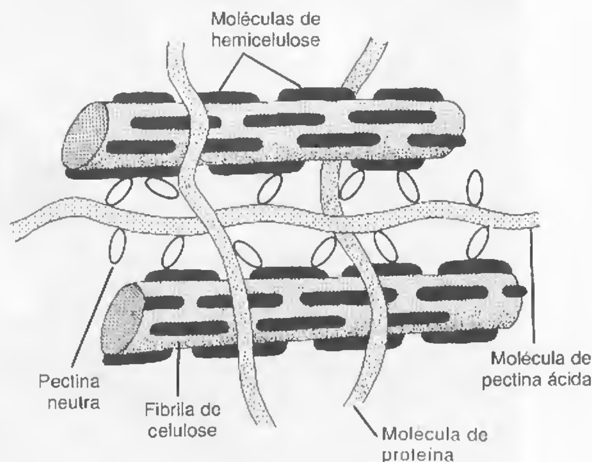


Fig. 13.3 Esquema ilustrando como as moléculas componentes da parede celular primária formam uma rede tridimensional hidrófila, que recobre as células vegetais.

15.000 dáltons. A maioria das moléculas que regulam o crescimento nas plantas (hormônios vegetais), como as auxinas, citoquininas e giberelinas, têm peso molecular abaixo de 500.

Nas células adultas, a **parede secundária** poderá ter uma ou mais camadas muito rígidas, contendo materiais de natureza variada, de acordo com as funções dos tecidos onde as células estão localizadas. Como exemplo, pode ser citado o depósito de **lignina** nas paredes de células, que morrem em seguida. As paredes deixadas formam elementos, chamados de **xilema**, que constituem o sistema vascular das plantas. Outro exemplo são as paredes altamente lignificadas, com função de suporte, que constituem o **esclerênquima**. As células de revestimento externo das folhas geralmente reforçam a sua superfície em contato com o ar com uma espessa camada constituída por polímeros de ácidos graxos de cadeia longa (**cutina**), revestida externamente por ceras de constituição complexa. Forma-se, assim, uma camada hidrofóbica, que protege a planta de uma perda excessiva de água, permitindo disciplinar a evaporação de água, processo muito importante para a circulação da seiva. Essa camada lipídica também protege as células das folhas contra a infecção por bactérias e fungos.

Além das funções já mencionadas, as paredes celulares protegem as células vegetais contra os efeitos da baixa pressão osmótica do meio extracelular, impedindo que as células arrebentem, pois, nas plantas, o líquido extracelular é hipotônico, ao contrário do que acontece nos animais, onde as células são banhadas por um líquido isotônico.

As células vegetais também se comunicam e interagem como ocorre com as células animais

Foi visto, em capítulo precedente, que a coordenação entre os tecidos de um organismo animal é feita, principalmente, através do sistema nervoso e de sinais químicos de ação local ou a distância (hormônios), e por comunicação intercelular. Nas plantas não existe sistema nervoso. A interação celular é feita, principalmente, por sinais químicos e por comunicações intercelulares diretas, processadas através de canais cilíndricos que atravessam as paredes de células vizinhas, comunicando os seus citoplasmas. Essas estruturas, chamadas de **plasmodesmos**, têm um diâmetro de 20 a 40 nm, são abundantes e geradas, simultaneamente, com a parede celular primária recém-formada no final da divisão celular (Figs. 13.1 e 13.11). Apesar do seu diâmetro relativamente largo, os plasmodesmos têm a mesma permeabilidade apresentada pelas junções comunicantes (*gap-junctions*) das células animais, dificultando o trânsito intercelular de moléculas de peso acima de 800 dáltons. Certos vírus vegetais, porém, conseguem transpor essa barreira, transferindo-se através dos plasmodesmos às células vizinhas.

As células vegetais têm vacúolos com características próprias, diferentes dos pequenos vacúolos das células animais

Além do cloroplasto, a organela mais evidente na célula vegetal é o **vacúolo**, estrutura que ocupa, em média, 50% do volume celular, oscilando entre 5 e 95% (Fig. 13.1). Trata-se de uma vesícula cheia de líquido e envolta por uma membrana.

Os vacúolos desempenham inúmeras funções, pois, além de acumularem nutrientes, metabólitos e catabólitos, servem de depósito de substâncias específicas como proteínas, ópio, látex e, também, de várias substâncias venenosas ou de gosto desagradável, que protegem a planta contra seus predadores (animais herbívoros).

Os vacúolos são estruturas que participam da manutenção do **turgor celular**, que aperta o citoplasma contra a parede celular como o ar aperta a câmara de ar contra o pneu. Quando falta água, a planta murcha, por diminuição do turgor intracelular. O meio aquoso, extracelular, das células vegetais é o líquido presente nas paredes celulares. Esse meio, como já foi mencionado, é hipotônico, o que acarreta entrada de água na célula e gera, no interior do citoplasma, uma pressão hidrostática forte, que é o turgor antes citado, e que empurra a membrana plasmática contra a parede celular, rígida. É o turgor que impede que a planta apresente um aspecto murcho. Isto pode ser facilmente observado pela comparação entre uma planta que recebe água com freqüência e uma planta não irrigada.

Como os vacúolos geralmente apertam o citoplasma da célula vegetal contra a sua parede, o transporte intracitoplasmático não se processa na célula vegetal como na animal, mesmo porque as células vegetais são muito mais longas (freqüentemente, atingem mais de 100 μm, podendo atingir até alguns milímetros), o que dificulta esses processos de transporte intracelular. Conseqüentemente, as células vegetais desenvolveram um processo que gera correntes citoplasmáticas — a **ciclose** — que se baseia na interação da actina com a miosina, presentes no citoplasma da célula vegetal. A ciclose facilita o transporte intracitoplasmático.

Com uma exceção, os processos gerais de síntese na célula vegetal são intracelulares e seguem o mesmo esquema da célula animal

Sabe-se que, nas células vegetais, a síntese protéica e dos complexos proteína-polissacarídeos seguem a mesma via observada nas células animais: polirribosoma → retículo endoplasmático → aparelho de Golgi. Porém, a celulose é sintetizada a partir de glicose fornecida pelo citoplasma por um complexo enzimático preso à membrana plasmática. As moléculas de celulose recém-formadas se polimerizam em situação extracelular, gerando fibrilas que se integram à parede celular em formação. Todavia, as fibrilas de celulose se formam sob a orientação dos microtúbulos citoplasmáticos, que, situados logo abaixo da membrana plasmática, criam um plano para orientar a direção das fibrilas de celulose à medida que elas são sintetizadas (Fig. 13.4).

Importância do citoesqueleto nas atividades das células vegetais

Os filamentos de actina e os microtúbulos, componentes do citoesqueleto das células animais, também participam das atividades das células vegetais. Os exemplos que se seguem são

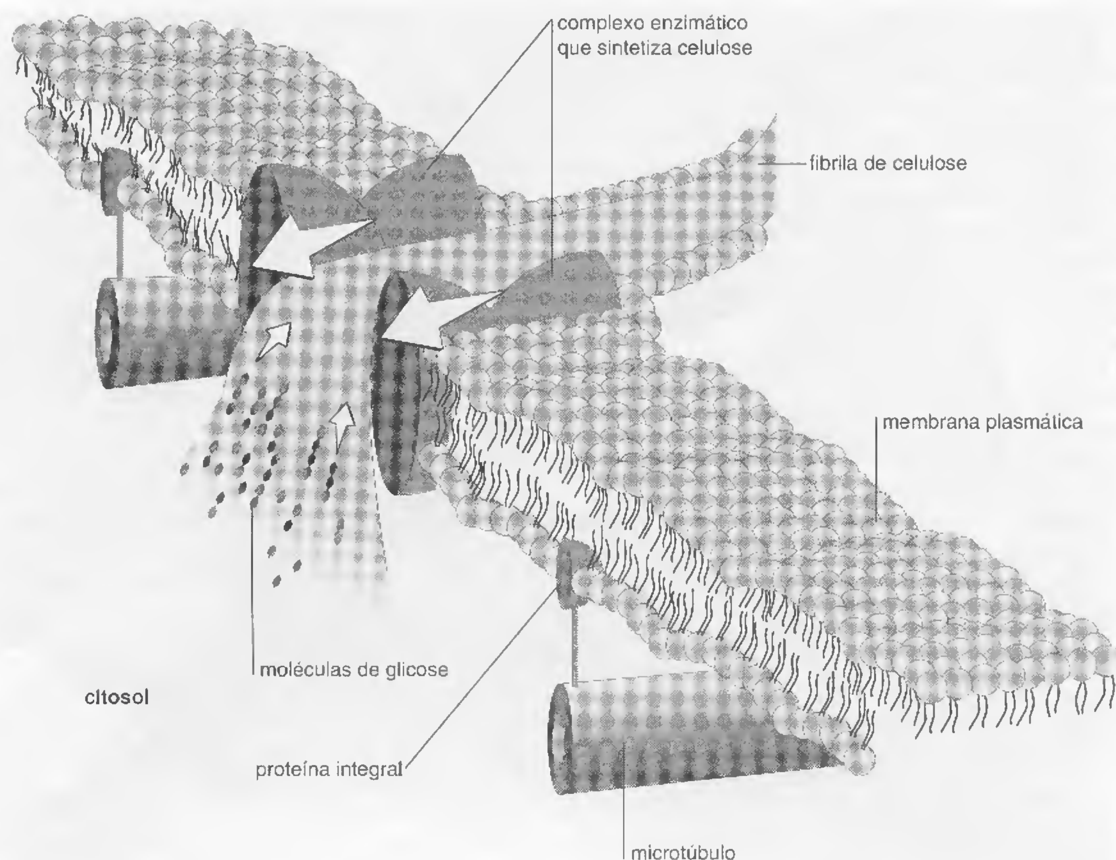


Fig. 13.4 Desenho mostrando a síntese de fibrila de celulose por um complexo enzimático localizado na membrana plasmática, a partir de glicose fornecida pelo citoplasma. O complexo enzimático se desloca ao longo dos microtúbulos superficiais, na direção indicada pelas setas grandes, deixando para trás a fibrila de celulose, que se forma no espaço extracelular. Observe que os microtúbulos estão fixados à membrana plasmática por proteinas integrais da membrana.

ilustrativos. 1.°) Foi verificado que, além dos microtúbulos do fuso mitótico, as células vegetais apresentam a maioria dos seus microtúbulos formando uma camada, logo abaixo da membrana plasmática, com orientação paralela, que é seguida pela primeira camada de fibrilas de celulose da parede celular. Quando, devido ao crescimento das células, ocorre a necessidade de mudar a orientação das fibrilas, observa-se, antes, um rearranjo correspondente nos microtúbulos. Quando se despolimerizam os microtúbulos submembranosos, com o uso da colchicina, continua a produção de celulose, mas a célula fica impossibilitada de reorientar a direção das fibrilas que se formam. Os microtúbulos, portanto, não participam da síntese de celulose, mas sim da orientação de suas moléculas. 2.°) A análise do alongamento dos tubos polínicos, que ocorre na reprodução das plantas, demonstrou que esses tubos contêm muitos microtúbulos, dispostos paralelamente ao eixo maior dos tubos polínicos, orientando o seu direcionamento. 3.°) Verificou-se que as células vegetais são capazes de regular a quantidade de luz que recebem, espalhando os seus cloroplastos uniformemente no citoplasma, quando há pouca luz, ou agrupando-os, quando há excesso de luz, ou então orientando os cloroplastos obliquamente, como folhas de veneziana, de acordo com a luminosidade. Há evidências de que esses movimentos dos cloroplastos ocorrem com a participação dos microfilamentos de actina do citoesqueleto da célula vegetal.

Os plastos, dos quais os mais importantes são os cloroplastos, são estruturas características das células vegetais

Os **plastos** são estruturas que contêm membrana dupla e um genoma próprio, características estas comuns com as mitocôndrias. É provável que também tenham tido origem em células procariontes, que se tornaram endossimbiontes, como ocorreu com as mitocôndrias. De acordo com a sua cor, convencionou-se classificar os plastos em **cromoplastos** (coloridos) e **leucoplastos** (sem cor).

Os cromoplastos das plantas superiores são denominados **cloroplastos**, apresentam cor verde e contêm clorofila (verde) e carotenóides (vermelhos). Os cloroplastos têm importância fundamental na economia da célula vegetal.

Os leucoplastos geralmente acumulam depósitos de compostos sintetizados, e compreendem os **amiloplastos**, **oleoplastos** e **proteoplastos**, que contêm amido, lipídios ou proteínas no seu interior, respectivamente.

Os cloroplastos são estruturas especializadas na transdução da energia solar em energia química que será acumulada em polissacarídeos

Admite-se que, com a evolução da vida anaeróbia existente inicialmente neste planeta, tenha-se exaurido a fonte preexistente de compostos orgânicos produzidos por processo geoquímico pré-biótico (v. Cap. 1). Surgiu, então, uma célula procarionte (bactéria) que desenvolveu mecanismos para captar a energia solar e utilizá-la para sintetizar compostos orgânicos, via geração de elétrons ricos em energia, derivados da decomposição da água. Nessa decomposição da água, formam-se elétrons, prótons e oxigênio. Iniciou-se assim, graças a esses organismos fotossintéticos, a vida aeróbia na Terra, pois, antes do aparecimento das bactérias autotróficas fotossintéticas, não existia oxigênio na atmosfera. Houve, assim, uma mudança profunda nas condições da superfície da Terra, pela presença de oxigênio na atmosfera e conseqüente geração da camada de ozônio (protetora contra a radiação ultravioleta), criando-se condições mais favoráveis para a evolução.

Admite-se que os cloroplastos tenham-se originado desses organismos procariontes fotossintéticos, que se instalaram em células eucariontes anaeróbias, criando uma situação mutuamente benéfica (endossimbiose). Durante o processo evolutivo, as bactérias precursoras dos cloroplastos, como as precursoras das mitocôndrias, transferiram parte do seu genoma para o DNA da célula hospedeira. Assim, passaram a depender do genoma da célula hospedeira para a síntese de muitas de suas proteínas.

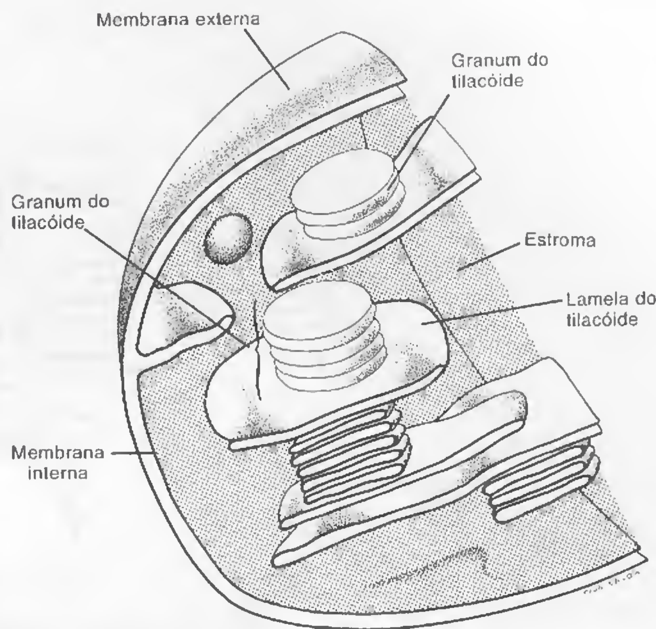


Fig. 13.5 Ilustração da estrutura dos cloroplastos de um vegetal superior. Observem-se as pilhas de vesículas membranosas achatadas que se prendem às lamelas formando os **grana.** O desenho mostra, também, os três compartimentos que constituem os cloroplastos: 1) o compartimento intermembranoso situado entre a membrana externa e a membrana interna do cloroplasto; 2) o estroma, que é o compartimento de maior tamanho, delimitado pelas duas membranas, e contendo os tilacóides; e 3) o espaço tilacoidal, que é o compartimento intratilacoidal, formado pelas membranas dos tilacóides (De Berkaloff *et al. Biologie et Physiologie Cellulaire*. 4ème ed. Hermann, Paris, 1973.)

Os cloroplastos possuem estruturas membranosas contendo clorofila não presas à membrana interna da organela

Os cloroplastos são estruturas de forma muito variável, envoltas por uma dupla membrana e apresentando um genoma não só de tamanho maior (maior número de genes) do que o das mitocôndrias, como também com maior número de cópias por organela.

No interior dos cloroplastos existem um **estroma** amorfo, rico em enzimas solúveis, e um sistema de membranas chamado de **tilacóide**, que não se comunica com a membrana interna do cloroplasto (Fig. 13.5).

O tilacóide, por sua vez, é constituído por um sistema de longas vesículas achatadas sobre as quais se empilham vesículas menores (Figs. 13.6 e 13.7). O conjunto de componentes do tilacóide é intercomunicante, formando o **espaço tilacoidal**, que é limitado por membrana impermeável aos íons e onde se encontram os corpúsculos elementares que contêm ATP-sintetase, enzima presente também na membrana interna das mitocôndrias. Tanto nos cloroplastos como nas mitocôndrias, a porção mais dilatada dos corpúsculos elementares faz saliência para dentro do estroma.

As vesículas menores que se empilham no tilacóide recebem o nome de **grana** (singular **granum**) e contêm, fazendo parte integral das suas membranas, a clorofila associada a vários outros pigmentos que aumentam o efeito da luz, porque absorvem a energia de certos comprimentos de onda, transferindo essa energia para a clorofila. Basicamente, os fótons absorvidos pela clorofila e pelos outros pigmentos presentes nesse sistema fotossensível levam a um deslocamento de elétrons nas órbitas de átomos da molécula de clorofila, induzindo um estado de excitação dos elétrons com elevação no seu nível energético. Essa energia é a que vai ser utilizada no processo de fotossíntese.

Como funcionam os cloroplastos na fotossíntese?

O estudo completo dos complexos processos bioquímicos que constituem a fotossíntese está fora dos limites traçados para este livro. Porém, basicamente, a fotossíntese ocorre devido à transferência de energia solar para elétrons da clorofila que são ativados (aumentam seu conteúdo energético) e à transferência desses elétrons para uma cadeia transportadora de elétrons, parecida com a existente nas mitocôndrias. Nessa cadeia, ocorre a liberação gradual da energia dos elétrons, que é utilizada para a síntese de ATP, de maneira análoga à que ocorre nas mitocôndrias (Fig. 13.8). Ao mesmo tempo, essa energia promove a oxidação da água (também chamada de **fotólise** da água), com transformação de NADP em NADPH e liberação de O_2. Esse processo é dependente de luz, e as reações que aí ocorrem são chama-

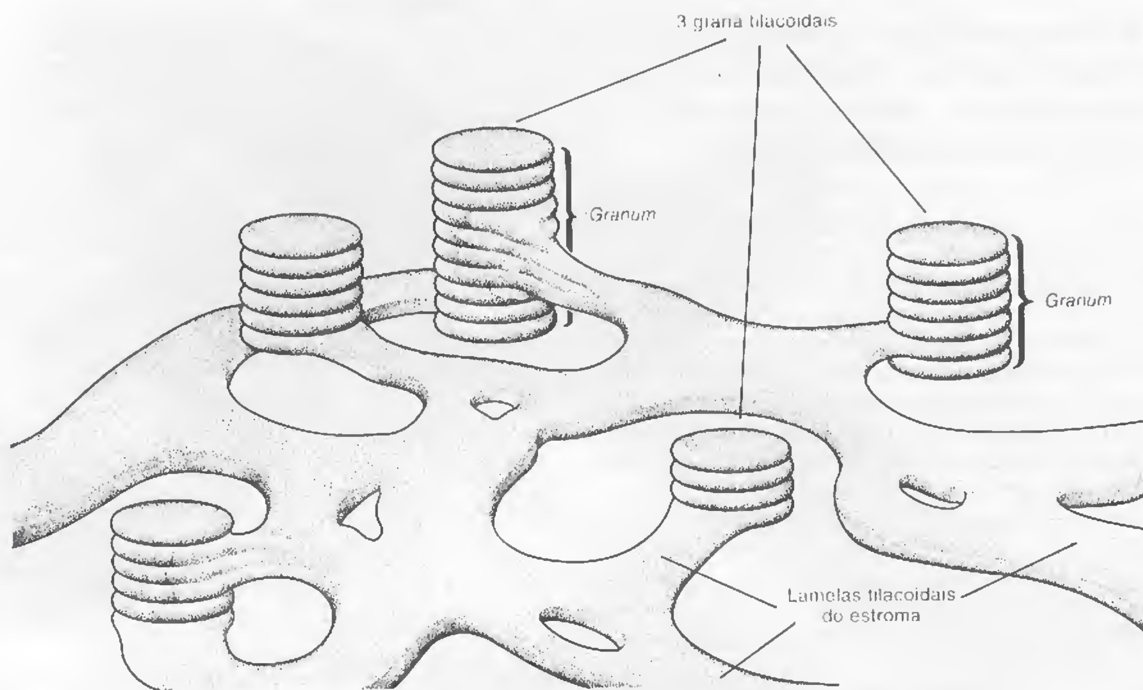


Fig. 13.6 Desenho tridimensional mostrando os tilacóides dos vegetais superiores. Os tilacóides são constituídos por membranas que delimitam o espaço tilacoidal (não visível no desenho) e apresentam-se sob a forma de lamelas alongadas, as **lamelas tilacoidais do estroma,** e sob a forma de pilhas de vesículas achatadas, como moedas, constituindo os **grana** (singular: **granum**). O espaço que aparece vazio no desenho, entre os tilacóides, é o estroma do cloroplasto.

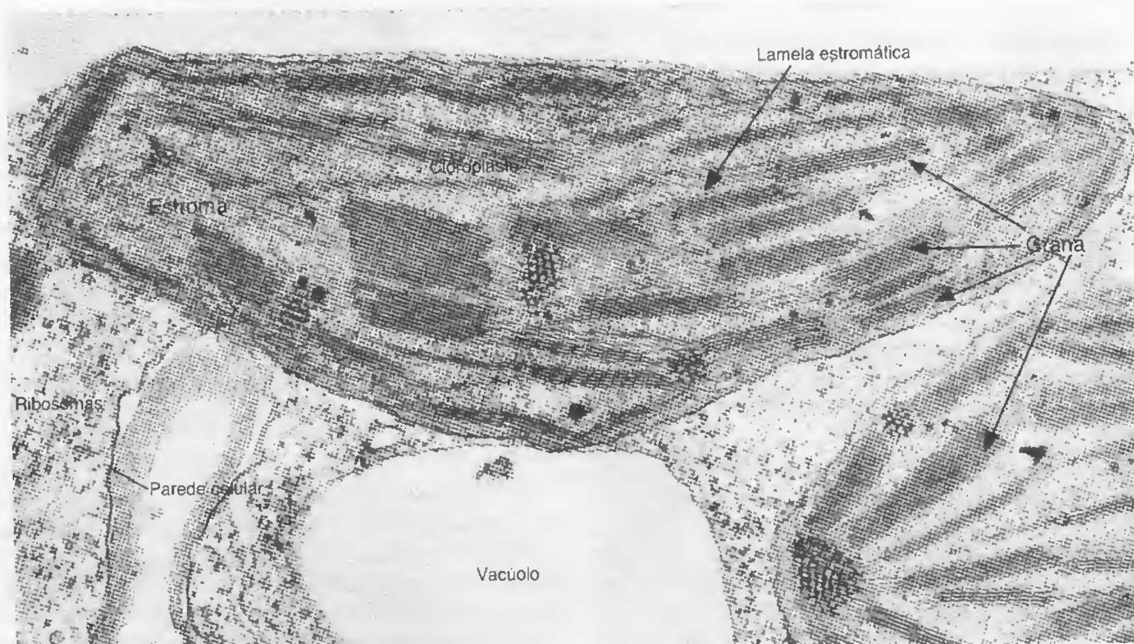


Fig. 13.7 Eletromicrografia de corte de folha de milho (*Zea mays L.*) mostrando um grande cloroplasto com grana, membrana limitante e estroma. 27.000 X. Cortesia de E. W. Kitajima.

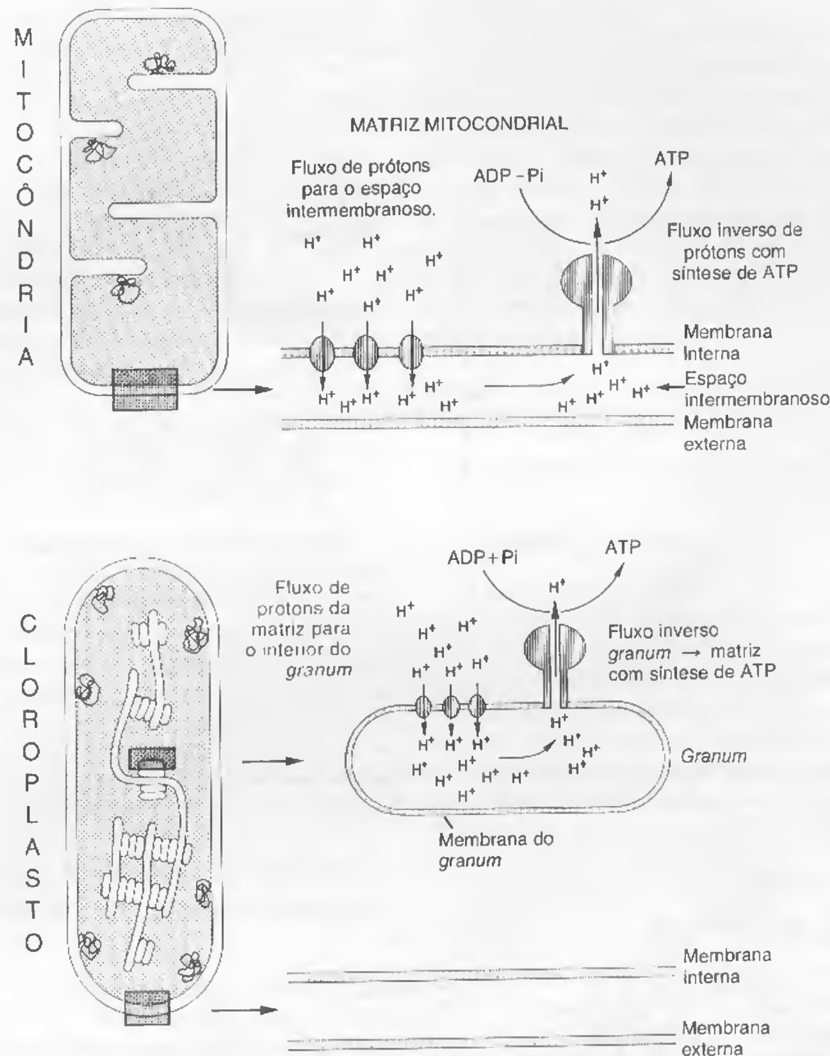


Fig. 13.8 Esquema ilustrando as semelhanças e diferenças entre a estrutura e atividade das mitocôndrias e cloroplastos no que se refere à produção de ATP. Nas mitocôndrias, a energia dos elétrons provenientes da degradação de compostos ricos em energia é utilizada para criar um fluxo de prótons para dentro do espaço intermembranoso, criando um gradiente que gera um fluxo de prótons em direção à matriz mitocondrial, levando à síntese de ATP. Nas mitocôndrias, o ATP é exportado para o citosol, onde é utilizado nas atividades celulares. Nas plantas, a energia dos elétrons ativados pela luz solar gera um fluxo de prótons para dentro do tilacóide, criando um gradiente de prótons que fluem em direção à matriz, sendo a energia acumulada em ATP, que é utilizado na síntese de compostos orgânicos dentro do próprio cloroplasto. Ao contrário das mitocôndrias, os cloroplastos não exportam ATP para o citosol.

das de **reações fotodependentes**. Em uma segunda etapa, o ATP e NADPH formados são utilizados para a síntese de hidratos de carbono com utilização de CO_2 atmosférico (fixação de CO_2). Estas **reações são fotoindependentes** (Fig. 13.9). Isto significa que a síntese de hidratos de carbono pela fotossíntese tem lugar durante o dia e, também, durante a noite.

As reações já mencionadas e que constituem a fotossíntese iniciam-se nas membranas do tilacóide (mais concentrados nos *grana*) e continuam no estroma dos cloroplastos.

A formação de oxigênio e a fixação de CO_2 ocorrem, pois, em etapas separadas e sucessivas da fotossíntese (Fig. 13.9). As principais transformações bioquímicas que ocorrem nos cloroplastos estão ilustradas na Fig. 13.10.

Transporte de moléculas através das membranas dos cloroplastos

Para entrarem nos cloroplastos ou dele saírem, as moléculas necessitam atravessar a membrana dupla dessa organela. A membrana externa é muito permeável e funciona principalmente como uma peneira, onde a passagem depende apenas do tamanho da molécula. Essa membrana externa contém proteínas denominadas **porinas**, semelhantes às existentes na membrana externa das mitocôndrias e na membrana plasmática das bactérias. As porinas formam canais, por onde passam moléculas com dimensões

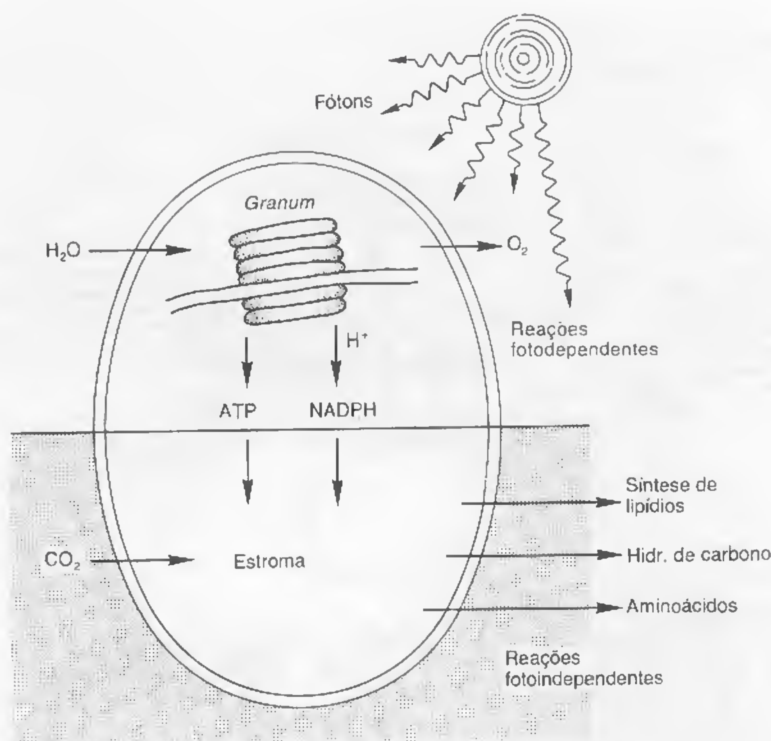


Fig. 13.9 Esquema ilustrando o local de ocorrência das reações fotodependentes nos cloroplastos. As reações fotodependentes se dão nos tilacóides, principalmente nos grana, enquanto as reações fotoindependentes se processam no estroma dos cloroplastos.

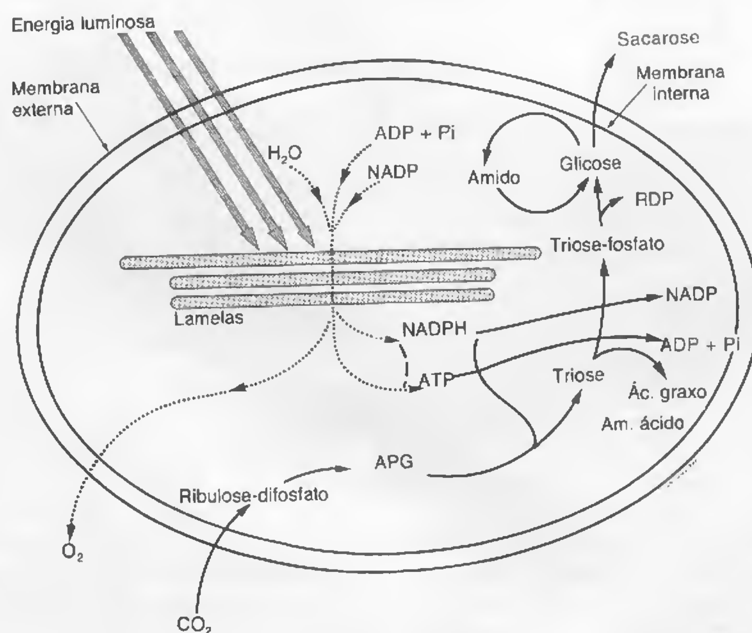


Fig. 13.10 Esta figura ilustra as principais transformações químicas que ocorrem nos cloroplastos. Na fase clara, a energia luminosa atravessa a membrana do cloroplasto atingindo os tilacóides, onde ocorre a fotólise da água, com produção de NADPH e ATP. Na fase escura, o CO_2 incorpora-se à ribulose-difosfato (RDP), que se transforma em hexose instável, que logo se decompõe em duas moléculas de uma triose: o ácido fosfoglicérico (APG). Este pode ser usado diretamente para a síntese de ácidos graxos e aminoácidos, ou então sofre novas modificações, que incluem fosforilação, com gasto de ATP e NADPH, produzindo compostos a partir dos quais são sintetizados os glicídeos ou a ribulose-difosfato. A ribulose-difosfato pode combinar-se com o CO_2, iniciando assim um novo ciclo. (De Berkaloff *et al. Biologie et Physiologie Cellulaire.* 4[ème] ed., Hermann, Paris, 1973.)

abaixo de certo tamanho. As porinas dos cloroplastos deixam passar, tanto para dentro como para fora da organela, moléculas com peso abaixo de 13.000 dáltons.

Porém, a membrana interna dos cloroplastos é muito pouco permeável, exercendo grande seletividade. Por ela, só passam substâncias que são capazes de atravessar canais específicos. Esses canais deixam passar, seletivamente, certos tipos de moléculas, impulsionadas por um gradiente favorável, e não por transporte ativo, como acontece nas mitocôndrias.

Os cloroplastos importam grandes quantidades de íons fosfato, porque os principais produtos da fotossíntese são transportados para o citosol sob a forma de moléculas fosforiladas. Dentre esses produtos, um dos mais importantes é o 3-fosfogliceraldeído. Na falta de fosfato inorgânico, os produtos da fotossíntese não podem ser transferidos para o citoplasma, ocorrendo inibição total do processo de fotossíntese. Na deficiência de fosfato inorgânico, tanto as reações fotodependentes como as fotoindependentes ficam paralisadas.

Mas a glicose é transportada para o citosol, na forma não-fosforilada, graças à presença de um transportador de glicose localizado na membrana interna dos cloroplastos.

Os cloroplastos, já estudados, parecem ser impermeáveis tanto a ADP quanto a ATP. Portanto, o ATP originado nos cloroplastos não podem ser usados para suprir as necessidades de energia do citoplasma. Mas o cloroplasto fornece ao citosol moléculas de hidratos de carbono e moléculas precursoras diversas que, no citoplasma, vão possibilitar a síntese de ATP nas mitocôndrias.

Papel do 3-fosfogliceraldeído produzido nos cloroplastos na formação de açúcares

O 3-fosfogliceraldeído é um importante metabólito sintetizado nos cloroplastos e que serve de precursor para diversos hidratos de carbono. Dentro do cloroplasto, ele é usado para formar o polissacarídeo amido ou outras moléculas complexas. Transferido para o citoplasma, o 3-fosfogliceraldeído pode ser utilizado para a síntese de diversas moléculas, ou então entrar diretamente para o ciclo da glicólise, produzindo piruvato, que pode ser aproveitado pelas mitocôndrias.

A sacarose, um dissacarídeo constituído de glicose e frutose, é o principal produto da fotossíntese na maioria dos vegetais superiores. Essas plantas armazenam nutrientes energéticos sob a forma de sacarose ou de amido. Muitas plantas armazenam esses dois hidratos de carbono em proporções variáveis, conforme a planta.

Além dos hidratos de carbono, já citados, os cloroplastos sintetizam ácidos graxos, lipídios, aminoácidos e proteínas. Dentre os lipídios, devem ser destacados as clorofilas e os carotenóides, que são de vital importância para as funções dos próprios cloroplastos. A capacidade sintética dos cloroplastos, em termos dos tipos de moléculas sintetizadas, é praticamente igual à de uma célula inteira.

Biologia molecular do DNA dos cloroplastos

Os cloroplastos têm uma quantidade muito maior de DNA do que as mitocôndrias. O seqüenciamento genético dos cloroplastos ainda está incompleto. Sabe-se, porém, que eles contêm maior número de genes do que as mitocôndrias. Como exemplo, pode ser citada a produção de enzimas utilizadas para a síntese de lipídios que têm origem no genoma do cloroplasto, o que não ocorre nas mitocôndrias. Em dois terços das plantas superiores, os cloroplastos não existem no zigoto (pólen), razão pela qual o genoma dos cloroplastos, nessas plantas, é de origem materna, sendo portanto de **transmissão materna**. Esse tipo de transmissão hereditária não-mendeliana, foi primeiro descrito no milho, que é uma das plantas cujo pólen não contém cloroplastos. No outro terço das plantas, o pólen tem cloroplastos e a herança é mista, materna e paterna.

A mitose na célula vegetal apresenta características diferentes desse processo na célula animal

A maior parte das mitoses nos vegetais ocorre nos **meristemas**, regiões localizadas principalmente na extremidade das raízes e galhos, que contêm células com intensa atividade mitótica, responsáveis pelo crescimento nessas regiões. A divisão não é restrita às células meristemáticas, e as células vegetais, ao contrário das células animais, freqüentemente podem voltar a se dividir depois de completamente diferenciadas. É mesmo possível, com condições adequadas, desdiferenciar uma célula vegetal diferenciada, a ponto de produzir uma célula totipotente que, sozinha, originará uma planta.

Essa capacidade é de importância econômica e agronômica, pois permite, a partir de um pedaço de meristema, obter inúmeras plantas originadas de uma planta só, gerando portanto um clone vegetal. Isso foi conseguido com muitas espécies de interesse econômico, como a batata, o fumo e a cenoura. Esse processo pode dar-se mesmo em células haplóides, utilizando-se células imaturas do pólen que vão gerar plantas haplóides, como é o caso do arroz e do fumo.

A divisão mitótica é diferente nas células vegetais, pois essas células não apresentam centríolos. A polimerização dos microtúbulos ocorre em uma região predeterminada, porém sem estrutura visível. O movimento cromosômico é semelhante ao da célula animal, com a migração cromosômica para os dois pólos. O processo de divisão se inicia por um alongamento que ocorre, principalmente, devido à expansão dos vacúolos, aumentando, assim, a pressão intracelular (turgor), o que por sua vez pressiona a parede celular. Esse processo é possível devido ao amolecimento da parede celular causado pela **auxina**, ativadora de uma bomba de prótons que migram para fora do citoplasma e acidificam a parede celular, afrouxando as ligações químicas entre a celulose e os outros componentes da parede celular (Fig. 13.11). A mitose ocorre depois do amolecimento da parede e do alongamento da célula. No fim da mitose, uma vez reconstruídos os dois núcleos, o complexo de Golgi entra em intensa atividade sintética, produzindo vesículas que se alinham na linha média, entre os dois núcleos, constituindo o **fragmoplasto** (Fig. 13.11). Essa estrutura se espessa, dando início à formação da parede celular. A localização da parede celular que separará as duas células-filhas, parece controlada por uma faixa circular de microtúbulos que aparece no equador da célula durante a prófase e onde, mais tarde, aparece o fragmoplasto. Durante a deposição do fragmoplasto, formam-se os plasmodesmos (Fig. 13.11).

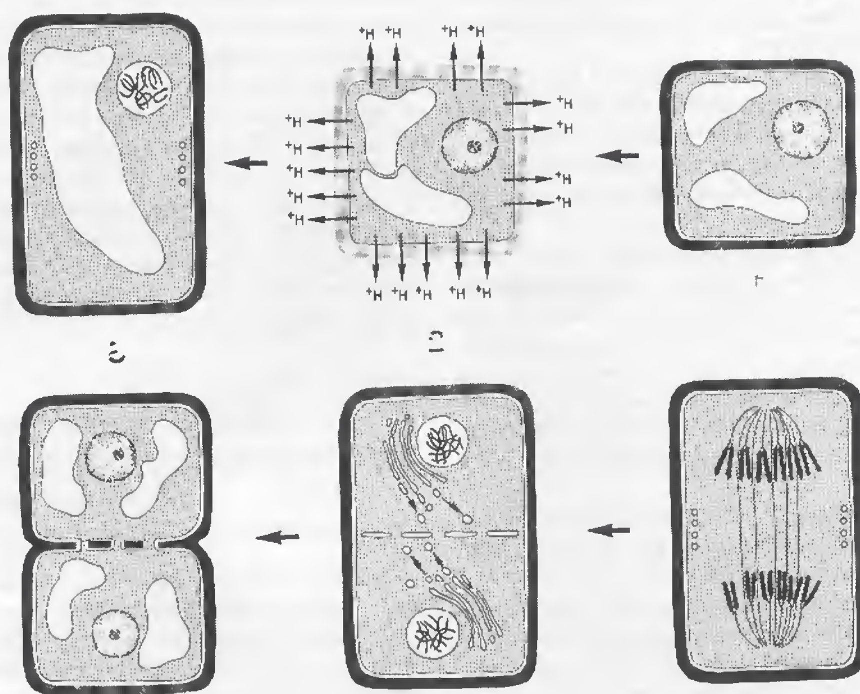


Fig. 13.11 Esquema ilustrando a divisão da célula vegetal. 1) Célula em repouso. 2) Acionamento da bomba de prótons, levando à acidificação e ao amolecimento da parede celular. 3) Expansão do vacúolo, com alongamento da célula, início da prófase e aparecimento de mitocôndrias esféricas no equador da célula. 4) Anáfase, com migração dos cromosomas para os pólos. 5) Reconstituição dos envoltórios nucleares e secreção das vesículas do fragmoplasto pelo aparelho de Golgi. 6) Aparecimento da parede entre as duas células-filhas. As comunicações celulares que se formam no fim da anáfase se conservam e vão constituir os plasmodesmos.

Os fatores de crescimento dos vegetais são moléculas pequenas

Os fatores de crescimento dos vegetais pertencem a apenas cinco classes: **auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abásico** e **gás etileno.** São todos de peso molecular baixo (abaixo de 500), o que lhes permite atravessar a parede celular. Apesar do seu pequeno número, a ação simultânea de vários desses fatores, em proporções variáveis, bem como a sua ação combinada com pequenas moléculas, diversifica os seus efeitos. Por exemplo, quando a auxina age simultaneamente com a citoquinina, acelera o crescimento de brotos de galhos; já a ação da auxina em presença de sacarose determina a diferenciação dos vasos vegetais (floema e xilema).

Diferenciação nas células vegetais

O estudo de culturas de tecidos mostrou que a diferenciação das células vegetais é um processo reversível, ao contrário do que ocorre com as células da maioria dos animais. Fragmentos de tecido vegetal, colocados em meio de cultura, crescem formando uma massa ou ***callus*** de células indiferenciadas com paredes delgadas e com grandes vacúolos. Células do *callus* podem ser mecanicamente dissociadas e cultivadas em suspensão. Muitas vezes, quando essas células isoladas são tratadas com uma combinação adequada de fatores de crescimento vegetais, cada célula pode gerar uma nova planta. Isto já foi verificado com a cenoura, a batata e o fumo, por exemplo.

Esse fenômeno demonstra que os genes das plantas não são inativados permanentemente durante a diferenciação, permitindo, pois, que se obtenha um número praticamente ilimitado de plantas, com as mesmas características genéticas da planta-mãe, isto é, um **clone.** Essa característica das plantas é de grande interesse científico e econômico e vem sendo largamente utilizada para a obtenção de grande quantidade de plantas com o mesmo genoma.

O fato de que as células imaturas do pólen (microsporos) podem gerar plantas completas com o número haplóide de cromosomas permitiu obter plantas haplóides que são muito utilizadas na biotecnologia vegetal.

Para isolar células vegetais, elas devem ser separadas mecanicamente, após tratamento prévio pela enzima celulase que digere a parede celular. As células assim obtidas, sem paredes, são muito frágeis, muito sensíveis a vírus e bactérias, e são chamadas de **protoplastos.** Os protoplastos são de grande utilidade em pesquisas de biotecnologia, pois permitem não só inoculações de vírus e bactérias, como também a introdução de DNA purificado (transfecção) e o preparo, por centrifugação fracionada, de componentes celulares como cloroplastos, vacúolos etc. Permitem também a fusão de células vegetais de espécies diferentes, obtendo-se em muitos casos plantas híbridas.

Sumário

Os vegetais superiores (plantas) são constituídos por células eucariontes muito semelhantes às células eucariontes dos animais.

No entanto, as células das plantas possuem certos componentes exclusivos. Além da membrana plasmática, essas células apresentam paredes rígidas que lhes conferem forma constante e proteção contra agressões mecânicas e contra a ruptura por desequilíbrio osmótico. Possuem também os plastos *principalmente os* cloroplastos, *que contêm* clorofila *e são responsáveis pela fotossíntese. Outra característica das células das plantas é a presença de grandes vacúolos citoplasmáticos que podem ocupar até 95% do volume total da célula.*

O material de reserva nas células vegetais é o amido e não o glicogênio, tão comum nas células dos animais. As células das plantas estabelecem conexões, os plasmodesmos, *comunicando as células umas com as outras e formando, assim, um vasto sincício protegido pelo arcabouço semi-rígido da parede celulósica.*

Bibliografia

ALBERSHEIM, P. The walks of growing plant cells. *Sci. Am.*, *232*:80, 1975.

ALBERTS, B. *et al. Molecular Biology of the Cell.* 3rd ed. Garland Press, New York, 1994.

ARNON, D. I. Photosynthetic activity of isolated chloroplasts. *Physiol. Rev.*, *47*:317, 1967.

BARBER, J. (ed.). *The Photosystems; Structure, Function and Molecular Biology.* Elsevier, 1992.

BOLWELL, G. P. Dynamic aspects of the plant extracellular matrix. *Int. Rev. Cytol.*, *46*:261, 1993.

CULOTTA, E. *et al.* Emerging plant science: frontiers in biothecnology. *Science*, *268*:654. 1995.

GRAY, J. C. and ROW, P. E. Protein translocation across choloroplast envelope membranes. *Trends Cell. Biol.*, *5*:243, 1995.

GIERSON, D. and COVEY, S. N. *Plant Molecular Biology.* Methuen, 1988.

ROBERTS, K. The plant extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 6:688. 1994.

14 Células Procariontes

Roteiro

- *As bactérias são células procariontes: não possuem envoltório nuclear, nem o elaborado sistema encontrado no citoplasma das células eucariontes, nem citoesqueleto. As células procariontes são as mais antigas na Terra.*
- *Após multiplicação do genoma, as células procariontes se dividem por fissão binária (não há mitose).*
- *À exceção das bactérias do grupo dos micoplasmas, as demais células procariontes apresentam uma parede rígida.*
- *Pelas características de suas paredes, as bactérias podem ser Gram-positivas ou Gram-negativas.*
- *Os diversos grupos de bactérias apresentam grande diversidade metabólica. Por isso, as bactérias são encontradas em ambientes muito diferentes.*
- *As bactérias patógenas podem produzir endotoxinas e exotoxinas.*
- *Os esporos são formas de resistência de certos tipos de bactérias.*
- *A permuta de informação genética entre células procariontes pode ser feita por transformação, conjugação e transdução.*
- *Os flagelos das células procariontes se movimentam por rotação, graças a um fluxo de prótons.*
- *Quimiotaxia: movimento aproximando ou afastando a célula de certos tipos de moléculas (nutrientes, tóxicos). Não é exclusivo das células procariontes.*
- *Os micoplasmas são as bactérias mais simples.*
- *As cianobactérias são fotossintéticas e algumas produzem NH_3 (amônia), podendo sobreviver à custa apenas de luz, N_2, CO_2 e H_2O.*

As células procariontes constituem as bactérias, que são os menores seres vivos e os mais simples do ponto de vista estrutural. A limitação do tamanho provavelmente se deve à inexistência, nas células procariontes, de compartimentos separados por membranas. Um elaborado sistema de membranas forma compartimentos funcionais nas células eucariontes, facilitando o fluxo e a concentração de metabólitos, enquanto, nas células procariontes, os metabólitos apenas se difundem pelo citoplasma. Não obstante a sua simplicidade estrutural, as bactérias são seres complexos e diversificados do ponto de vista bioquímico, o que permite sua adaptação às mais variadas condições de vida.

As bactérias assumem formas diversas. As esféricas são chamadas **cocos**; quando alongadas, recebem o nome de **bacilos**; e em formas helicoidais, em geral móveis, são denominadas **espirilos**. Muito freqüentemente, as células bacterianas aparecem em grupos e não isoladas. Os cocos em pares formam os **diplococos**; dispostos em fileiras, são chamados **estreptococos** e, quando aparecem como cachos de uvas, denominam-se **estafilococos**.

Apesar de sua complexidade metabólica, a estrutura das bactérias é simples

O estudo da estrutura das bactérias (Fig. 14.1) mostra que elas apresentam, envolvendo o seu citoplasma, uma **membrana plasmática** em torno da qual se encontra uma espessa e rígida camada: a **parede bacteriana**. Por fora da parede, pode ocorrer uma terceira camada, viscosa, que, em algumas espécies, se espessa e se organiza, formando a **cápsula**. No interior da célula procarionte, além do citoplasma, encontram-se uma região correspondente ao núcleo, chamada **nucleóide**, e grânulos diversos. Freqüentemente partem da superfície bacteriana prolongamentos filamentosos: são os **flagelos** e as **fímbrias** (Fig. 14.1).

A **membrana plasmática** (Fig. 14.2) das bactérias tem a mesma estrutura trilaminar da membrana plasmática das células eucariontes. Nela se situam receptores, proteínas relacionadas com o transporte transmembrana e as moléculas da cadeia respiratória análoga à existente na membrana interna das mitocôndrias das células eucariontes.

Às vezes observam-se invaginações irregulares da membrana, formando um complexo, ao qual se deu o nome de **mesossoma** (*meso*, meio, e *soma*, corpo). Estas estruturas (Fig. 14.1) aumentam a superfície da membrana, onde estão situadas as enzimas respiratórias. Os mesossomas também participam da formação dos septos e da parede, que aparecem quando a bactéria se divide.

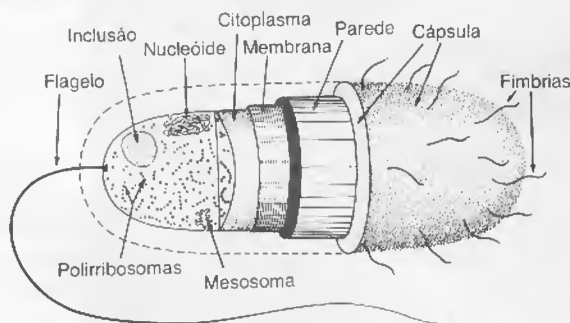


Fig. 14.1 Desenho tridimensional mostrando as estruturas principais da bactéria. Observe-se que o flagelo apresenta uma dilatação em sua base, que corresponde ao gancho e ao "rotor". O nucleóide está relacionado com uma dobra da membrana plasmática.

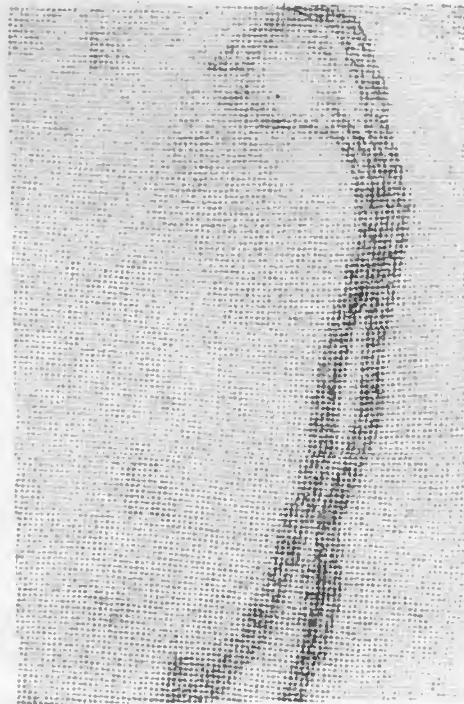


Fig. 14.2 Eletromicrografia de cortes da membrana plasmática da bactéria *Escherichia coli*, isolada por centrifugação fracionada. Notar que essa membrana plasmática é semelhante às unidades de membrana, trilaminares, das células eucariontes. 175.000 ×. (Cortesia de J. A. Serrano, Centro de Microscopia Eletrônica. Universidade de Los Andes, Merida, Venezuela.)

Cada bactéria contém um ou mais **nucleóides**, que se apresentam como massas arredondadas. O nucleóide (Fig. 14.3) é formado por um filamento circular de DNA, que se apresenta enovelado. É visível ao microscópio eletrônico e prende-se a uma invaginação da membrana plasmática (Figs. 14.1 e 14.4). Esse DNA tem a forma de um filamento constituído por duas cadeias dispostas em hélice. O filamento de DNA mede cerca de 1 mm de comprimento e apresenta as extremidades fundidas, tornando-se circular. Esse filamento circular de DNA é denominado **cromosoma bacteriano**, embora seja diferente do cromosoma das células eucariontes.

O DNA da bactéria se divide por fissão longitudinal, e não ocorre o aparecimento de cromosomas condensados, como se observa na mitose das células eucariontes. Calcula-se que uma bactéria deve ter DNA suficiente para codificar 2.000 a 3.000 proteínas de peso médio.

Todas as bactérias, exceto os micoplasmas, apresentam uma parede (Fig. 14.4) rígida, responsável pela forma da célula e que a protege contra a ruptura e contra a penetração de vírus. Pelo transporte ativo de moléculas e íons, a maioria das bactérias mantém pressão osmótica interna de 5 a 20 atmosferas, muito mais elevada do que a pressão osmótica dos ambientes onde elas vivem na natureza. A parede impede que essas bactérias se rompam, possibilitando sua sobrevivência e multiplicação em meio hipotônico. Apesar de ser rígida e resistente, a parede é permeável, o que facilita a nutrição da célula e a saída de moléculas diversas

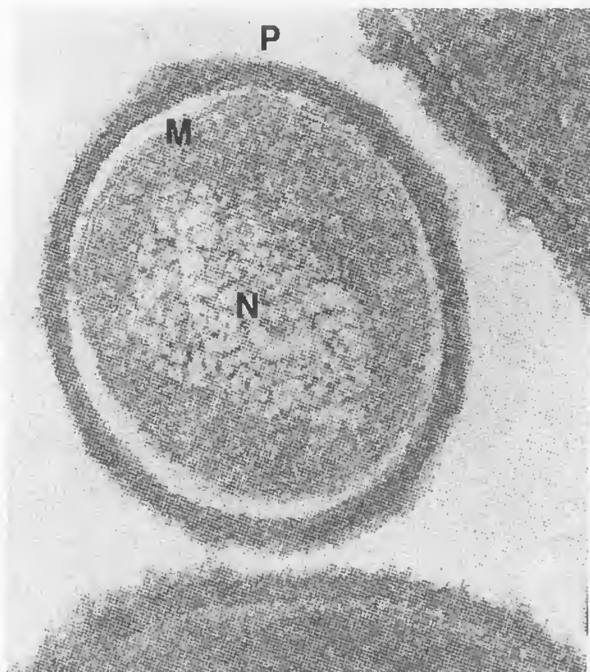


Fig. 14.3 Micrografia eletrônica de corte de bactéria, vendo-se a parede (**P**), a membrana plasmática (**M**) e o nucleóide (**N**). O espaço entre a membrana e a parede é um artefato, devido à retração da célula durante a realização do preparado.

nela produzidas. A parede contém diversos determinantes antigênicos que podem ser utilizados para a identificação das bactérias.

Devido às propriedades de suas paredes, as bactérias são divididas em dois grandes grupos: as **Gram-positivas** e as **Gram-negativas**. A colocação de um determinado tipo de bactéria num desses grupos depende de seu comportamento diante da coloração de Gram. As bactérias que, após aplicação da técnica de Gram, aparecem coradas em roxo são chamadas Gram-positivas. As que não retêm a cor roxa são as Gram-negativas. Para facilitar sua visualização ao microscópio, as últimas são geralmente coradas em vermelho com safranina ou fucsina, que não altera a cor roxa das Gram-positivas.

A **parede das células Gram-positivas** é simples, sendo formada apenas por uma espessa camada de **peptidoglicanas** (sinônimos: mureína, mucopeptídeo) situada entre a membrana citoplasmática e a cápsula, mais externa, de espessura e consistência muito variáveis. As peptidoglicanas são compostos típicos das paredes bacterianas, e constituídos de cadeias peptídicas ligadas a uma cadeia de hidratos de carbono. São responsáveis pela rigidez e pela resistência da parede das bactérias. A parede das células Gram-positivas geralmente possui moléculas de ácidos teicóicos, que nunca estão presentes nas células Gram-negativas.

A **parede das bactérias Gram-negativas** é muito complexa (Fig. 14.5), sendo formada pelas seguintes camadas, de dentro para fora: 1) uma camada de peptidoglicanas, mais delgada do que a das bactérias Gram-positivas; 2) uma camada de lipoproteínas; 3) a membrana externa, de estrutura trilaminar, como as das demais membranas celulares; e 4) a camada de lipopolissacarídeos (LPS).

A membrana externa é uma estrutura peculiar. Embora localizada na parte externa da parede, tem estrutura semelhante às membranas celulares em geral. A membrana externa tem a arquitetura de um mosaico fluido, mas os fosfolipídios de seu folheto externo são substituídos por abundantes moléculas de lipopolissacarídeos (LPS), que chegam a constituir uma verdadeira camada, formando uma forte barreira em volta da célula. Entre outras funções, os lipopolissacarídeos têm um papel protetor, como, por exemplo, nas bactérias entéricas que resistem às enzimas hidrolíticas e aos sais biliares do tubo digestivo. A membrana externa das bactérias Gram-negativas contém moléculas protéicas, denominadas **porinas**, que formam canais por onde penetram diversas substâncias, como aminoácidos e hidratos de carbono. Como a camada de lipopolissacarídeos é impermeável, praticamente todas as moléculas que penetram na pare-

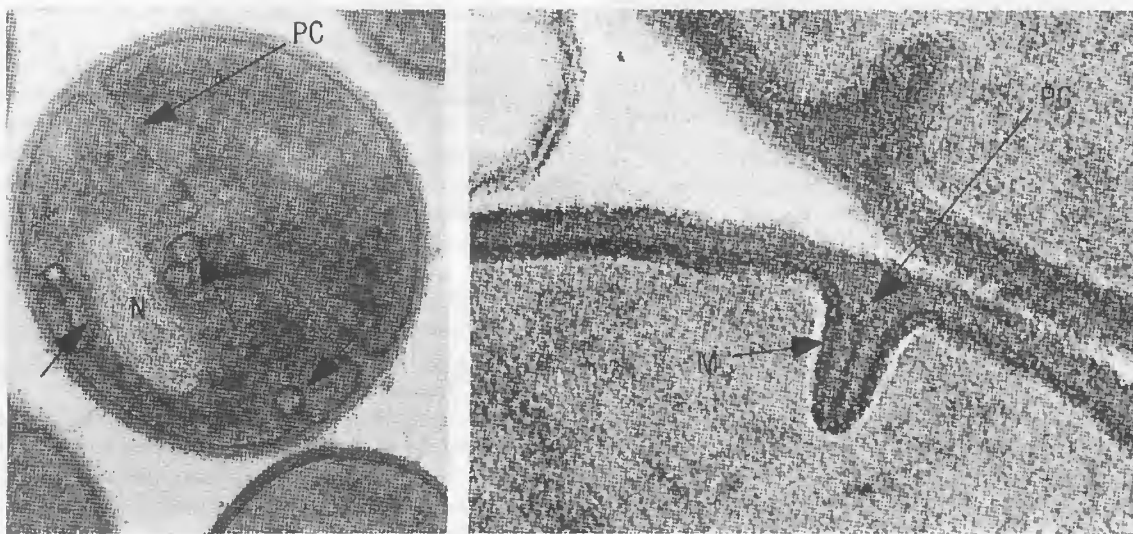


Fig. 14.4 Eletromicrografias de cortes da bactéria *Staphylococcus aureus* em fase de divisão. Notar a parede celular (**PC**), formando um septo que vai dividir a bactéria. Abaixo da parede celular, a membrana plasmática, **M**. A seta indica um mesosoma. Em **N**, o nucleóide, com o seu aspecto filamentoso característico. À **esquerda**, em pequeno aumento. À **direita**, aumento de 110.000 ×. (Cortesia de T. J. Popkin, T. S. Theodore e R. M. Cole, *J. Bact.*, *107*:907, 1971. Reprodução autorizada.)

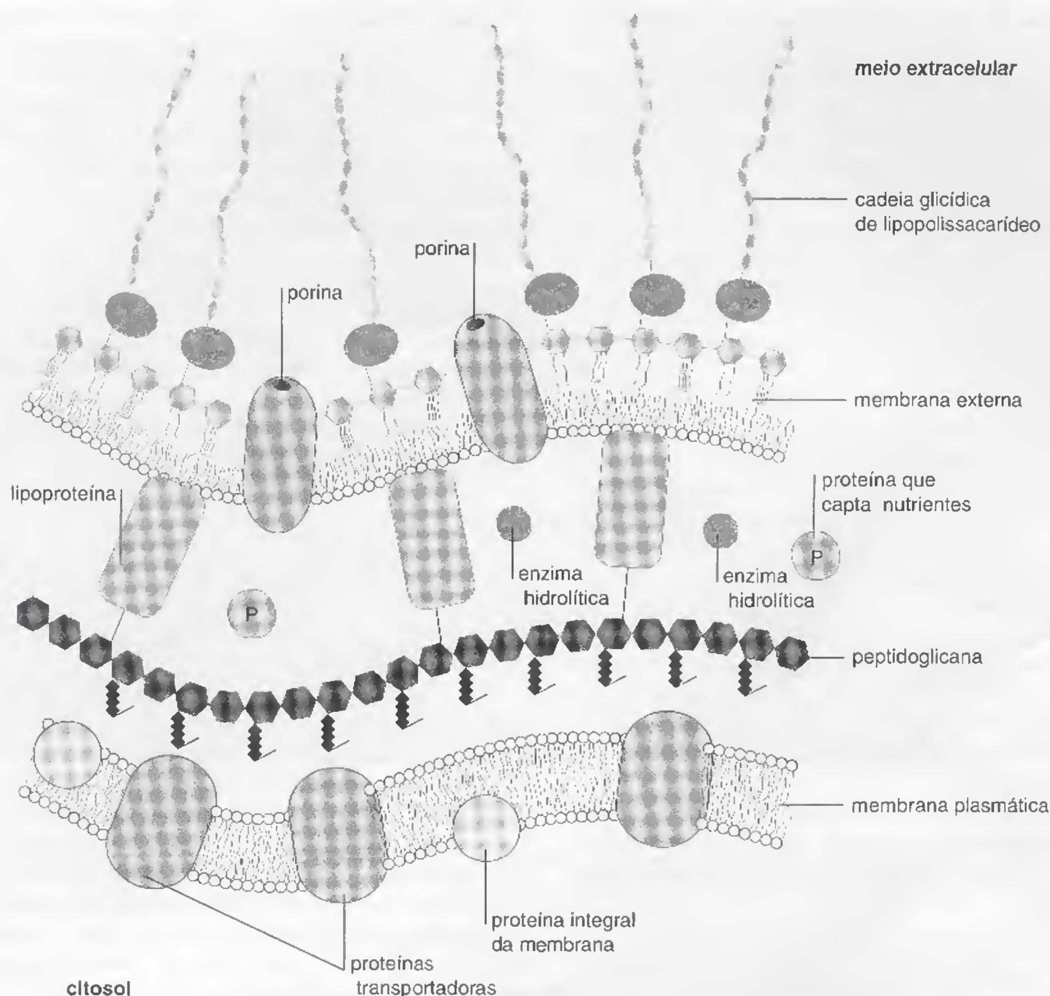


Fig. 14.5 Estrutura molecular da parede das bactérias Gram-negativas. Essas paredes têm três camadas: 1) uma delgada camada de peptidoglicana; 2) uma camada de lipoproteínas, que se prende de um lado às peptidoglicanas e, do outro, aos lipídios da membrana externa; 3) a membrana externa; e 4) a camada de lipossacarídeos, ligada à membrana externa. Observe que essa parede contém proteínas (P) que captam nutrientes e, também, enzimas hidrolíticas que degradam as moléculas captadas.

de, para atingirem a membrana plasmática, o fazem pelos canais de porinas.

A **cápsula**, presente em muitas bactérias (Fig. 14.1), tanto Gram-positivas como Gram-negativas, é uma camada de espessura e constituição química variadas e de consistência mucosa. Costuma conter antígenos potentes, conferindo à bactéria propriedades imunológicas muito definidas. Apesar de a presença da cápsula não estar sempre relacionada à capacidade da bactéria em agredir o hospedeiro, não há dúvida de que essa estrutura empresta às bactérias patogênicas (*pathos*, doenças, e *genos*, gerar) a capacidade de resistir à fagocitose e ao ataque de outros elementos de defesa do organismo, explicando assim, em parte, a sua atividade patogênica.

A hidrólise da parede bacteriana ou o bloqueio de sua síntese podem gerar os **protoplastos** ou os **esferoplastos**. A remoção da parede deve ser feita em meio de cultivo da pressão osmótica adequada, para prevenir a ruptura das células sem parede. Geralmente, os protoplastos são derivados das bactérias Gram-positivas, e os esferoplastos, das Gram-negativas. Ambos são esféricos. A diferença essencial entre os dois é que os protoplastos são totalmente desprovidos de constituintes da parede e, por isso, osmoticamente muito mais frágeis que os esferoplastos, que retêm algum material da membrana externa da parede bacteriana. As células sem parede e que são capazes de proliferar nos cultivos ou nos hospedeiros recebem o nome de **formas L**. Algumas destas formas L podem voltar a sintetizar paredes, revertendo à sua forma normal. Outras perdem definitivamente a capacidade de voltar a fabricar novas paredes.

Certas bactérias produzem formas L espontaneamente, muitas vezes causando doenças crônicas e de tratamento difícil, porque as formas L são mais resistentes a muitos antibióticos.

Sendo desprovido de organelas membranosas, o citoplasma das células bacterianas é formado essencialmente pelo **citosol**, contendo moderada quantidade de ribosomas, que se prendem a moléculas de RNA mensageiro, para formar **polirribosomas**. Nas bactérias fotossintéticas, o pigmento captador da luz solar se localiza em **lamelas paralelas** situadas próximo à membrana plasmática e que, às vezes, se dobram e formam corpúsculos isolados.

As bactérias podem acumular material de reserva em grânulos osmoticamente inertes, não envolvidos por membrana. Na falta de nitrogênio, quando não podem sintetizar proteínas nem ácidos nucléicos, as bactérias acumulam o carbono excedente sob

a forma de polímeros do ácido hidroxibutírico ou de polímeros de glicose, como o amido e o glicogênio. Esses grânulos são usados como fonte de carbono para a síntese de proteínas e ácidos nucléicos, quando as células obtêm nitrogênio suficiente. São muito freqüentes os grânulos de metafosfato polimerizado, que foram denominados **grânulos de volutina** antes de sua caracterização química.

O citoesqueleto, encontrado nas células eucariontes, é inexistente ou muito pouco desenvolvido nas células procariontes.

Certas bactérias que vivem e proliferam em meio aquático possuem vesículas contendo gás que controlam a flutuação do microrganismo. Essas vesículas são limitadas por membranas protéicas e, portanto, diferentes das membranas em geral, onde predominam lipídios

Os **prolongamentos** observados na superfície das bactérias são de dois tipos — os flagelos e as fímbrias (Fig. 14.1). Os **flagelos** são órgãos de locomoção filamentosos, medindo geralmente de 3 a 12 μm de comprimento e 12 a 30 nm de diâmetro (Fig. 14.6). Porém, o flagelo, em certas bactérias, pode atingir algumas centenas de micrômetros de comprimento. Na base do flagelo existe uma dilatação, principal responsável pela rotação do flagelo, que se encontra imersa na parede e na membrana plasmática da célula bacteriana. O flagelo é um polímero de uma proteína, a **flagelina**, característica de cada espécie de bactéria. Os **monômeros de flagelina** se organizam em 11 protofilamentos para constituir o flagelo. A síntese do flagelo bacteriano é inibida por cloranfenicol e fluorofenilalanina, dois compostos inibidores da síntese protéica.

Não há indícios de que o ATP participe do movimento flagelar. Os dados disponíveis sugerem que a energia é fornecida por um fluxo de prótons. Os flagelos são rotores semi-rígidos aos quais a célula imprime um movimento de rotação. O flagelo pode girar num sentido algum tempo e, em seguida, girar no sentido contrário, alterando a direção do movimento bacteriano.

As **fímbrias** (Fig. 14.7) são filamentos rígidos, de natureza protéica, não associados à locomoção, mais finos e mais curtos do que os flagelos. Como estes, as fímbrias são compostas de subunidades protéicas. Há duas classes de fímbrias: as **fímbrias comuns**, que promovem a aderência das bactérias às células hospedeiras, tendo assim relevante papel na patogenicidade bacteriana, e as **fímbrias sexuais**, que são responsáveis pela formação de canais de transferência de DNA entre duas bactérias durante o processo de **conjugação**, que será estudado mais adiante. Esta passagem é unidirecional: da célula bacteriana doadora para a célula receptora.

A Fig. 14.8 dá uma idéia das funções dos principais componentes de célula bacteriana.



Fig. 14.6 Eletromicrografia de preparado total da bactéria *Benechea para-hemolytica* mostrando um flagelo, polar, mais grosso, e vários outros flagelos mais finos. (De R. D. Allen e P. Bauman, *J. Bact.*, *107*:295, 1971. Reprodução autorizada.)

O metabolismo bacteriano é muito diversificado

Não existe grupo de ser vivo que tenha metabolismo mais diversificado do que as bactérias. Graças a esta característica, são encontradas nas mais variadas condições ecológicas. Algumas bactérias vivem em baixas temperaturas, enquanto outras estão adaptadas a temperaturas tidas como incompatíveis com a vida. É o caso das bactérias termofílicas, que chegam a viver a 60°C. Essa versatilidade explica a distribuição universal das bactérias.

Do ponto de vista metabólico, as bactérias podem ser divididas em **fototróficas** (*photos*, luz, e *trophe*, nutrição), quando utilizam a luz solar como fonte de energia, e **quimiotróficas,** quando utilizam a energia presente em compostos químicos.

No segundo grupo, se o composto doador de energia é inorgânico, as bactérias são **quimiolitotróficas.** Quando o composto é orgânico, a bactéria é chamada **quimiorganotrófica.** Estas últimas oxidam ou fermentam compostos orgânicos, deles retirando a energia para os seus processos vitais.

Todas as bactérias parasitas são quimiorganotróficas, e as mais exigentes requerem, além de hidratos de carbono, aminoácidos e certas vitaminas para o seu crescimento. Essas bactérias obtêm a energia necessária para a sua vida através da oxidação de hidratos de carbono, gorduras e proteínas. Algumas, porém, retiram energia da decomposição anaeróbia (fermentação) dos hidratos de carbono, e outras espécies só crescem na ausência de oxigênio (**bactérias anaeróbias).** Costuma-se chamar de **anaeróbias facultativas** às bactérias que podem viver tanto em meio aeróbio como anaeróbio. As bactérias quimiorganotróficas aeróbias têm metabolismo muito parecido com o da maioria das células animais (eucariontes). Os hidratos de carbono são muito utilizados por estas bactérias como fonte de energia.

A capacidade de metabolizar determinados tipos de açúcares, aliada à morfologia e afinidade das bactérias aos corantes, é critério muito usado para a sua identificação e classificação. Componentes dos flagelos, da cápsula e da parede constituem numerosos antígenos, fornecendo as bases para uma análise imunológica, também importante para a identificação das bactérias, passo importante para orientar o tratamento das infecções bacterianas.

Vários tipos de bactérias contêm como componentes de sua estrutura, ou liberam para o meio de cultura, substâncias tóxicas, que recebem o nome de **endotoxinas e exotoxinas bacteri-**

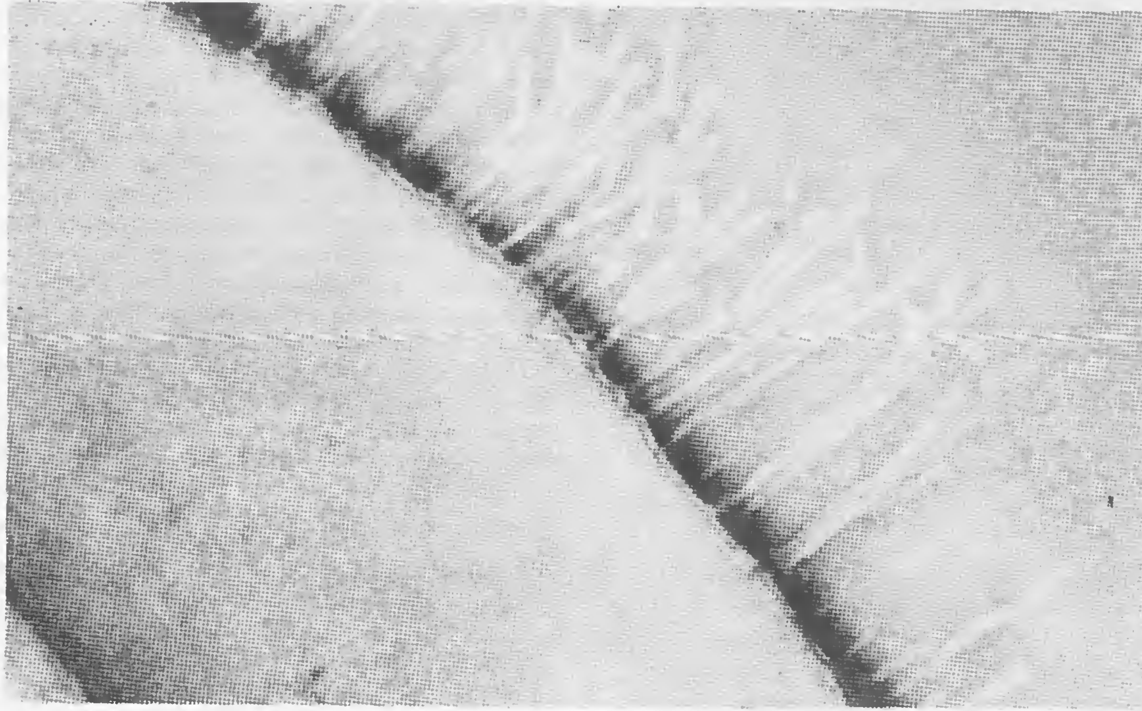


Fig. 14.7 Eletromicrografia de bactéria mostrando numerosas fímbrias, que são prolongamentos da superfície celular. "Coloração" negativa. 120.000 ×. (Cortesia de J. A. Serrano, Centro de Microscopia Eletrônica, Universidade de Los Andes, Merida, Venezuela.)

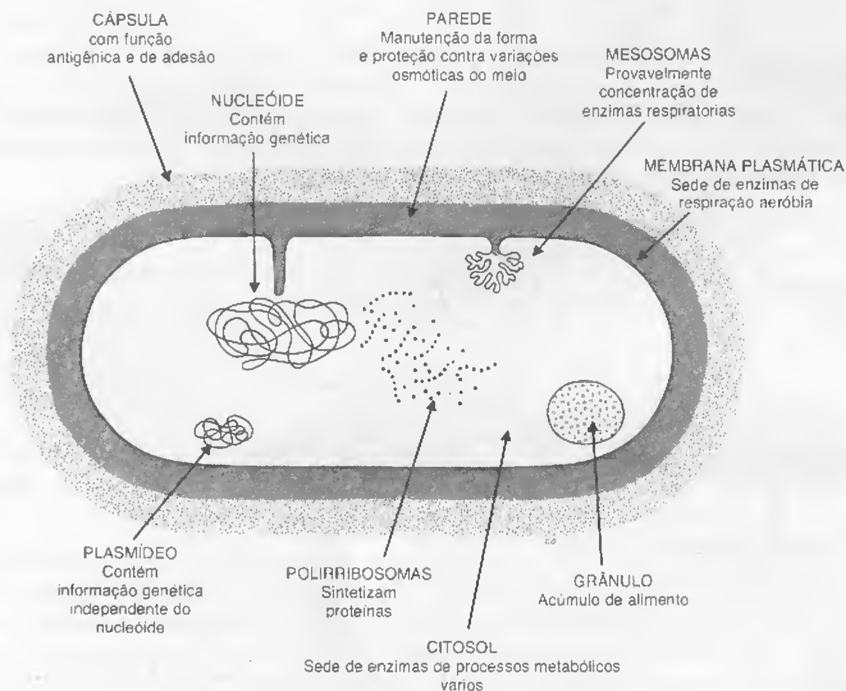


Fig. 14.8 Desenho esquemático ilustrando as funções dos principais componentes de uma célula bacteriana.

Tabela 14.1 Algumas características das exotoxinas e das endotoxinas (lipopolissacarídeos) das bactérias patogênicas*

Exotoxinas	Endotoxinas
Secretadas pelas bactérias; atingem concentrações altas no meio de cultura.	Parte integrante da parede das bactérias Gram-negativas. São liberadas, principalmente, quando as bactérias morrem.
Produzidas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.	Encontradas exclusivamente nas bactérias Gram-negativas.
São polipeptídeos com peso molecular de 10.000 a 900.000 dáltons.	São lipopolissacarídeos da parede bacteriana.
Altamente tóxicas; quando injetadas em animais de laboratório, bastam alguns microgramas para causar a morte.	Toxicidade moderada.
Instáveis: a toxidez é destruída pelo aquecimento acima de 60°C.	Mais estáveis; resistem ao aquecimento.
Ligam-se a receptores da membrana celular.	Não foi observada a ligação com receptores.
Geralmente não causam febre.	Geralmente causam febre, pela liberação de substâncias ativas no organismo infectado.

*Adaptado e reproduzido com permissão de Jawetz, E. *et al. Medical Microbiology*. 18th ed. Appleton & Lange, 1989.

anas (Tabela 14.1). Essas toxinas são em parte responsáveis pela agressão das bactérias aos organismos que parasitam.

Duas das exotoxinas mais potentes que se conhecem são produzidas pelo *Clostridium tetani* e *Clostridium botulinum*, causadores do tétano e do botulismo, respectivamente. A toxina botulínica é tão potente que apenas 0,001 – 0,002 mg bastam para causar a morte de um ser humano adulto.

Outro exemplo de exotoxina é a secretada pelo *Vibrio cholerae*. Esta bactéria, sendo introduzida no organismo pela água ou pelos alimentos, se multiplica e se fixa nas microvilosidades das células intestinais, produzindo uma exotoxina constituída de duas subunidades. A subunidade A se prende à membrana celular, e a subunidade B penetra na célula, onde causa aumento na atividade da adenilato ciclase, com o conseqüente aumento na quantidade de AMP cíclico. Tem lugar, então, uma extensa secreção de eletrólitos para a luz intestinal, com perda de bicarbonato e diminuição na absorção de sódio e cloreto. Ocorre diarréia acentuada, que pode levar à morte por desidratação, acidose e desequilíbrio eletrolítico do meio interno.

Os processos metabólicos das bactérias são semelhantes aos das células eucariontes, diferindo em alguns detalhes. Essas diferenças permitem, na clínica, o uso de substâncias que bloqueiam eletivamente certas vias metabólicas, como se pode ver na Fig. 14.9.

Para resistir aos ambientes adversos, as bactérias formam esporos

Algumas espécies bacterianas reagem a situações adversas do meio ambiente, formando estruturas resistentes, chamadas **esporos**, as quais suportam condições críticas de temperatura e falta de água que, ordinariamente, levariam à morte.

Basicamente, os esporos são células cujo citoplasma contém pouquíssima água, quase não têm atividade metabólica e estão circundados por espesso envoltório. A Fig. 14.10 explica a formação dos esporos.

Concomitantemente às modificações morfológicas (Fig. 14.11), ocorrem alterações bioquímicas como diminuição do número de ribosomas, do teor de RNA mensageiro e dos citocromos da cadeia de transporte de elétrons. Ao mesmo tempo são sintetizados novas proteínas e lipídios, que formam o envoltório do esporo.

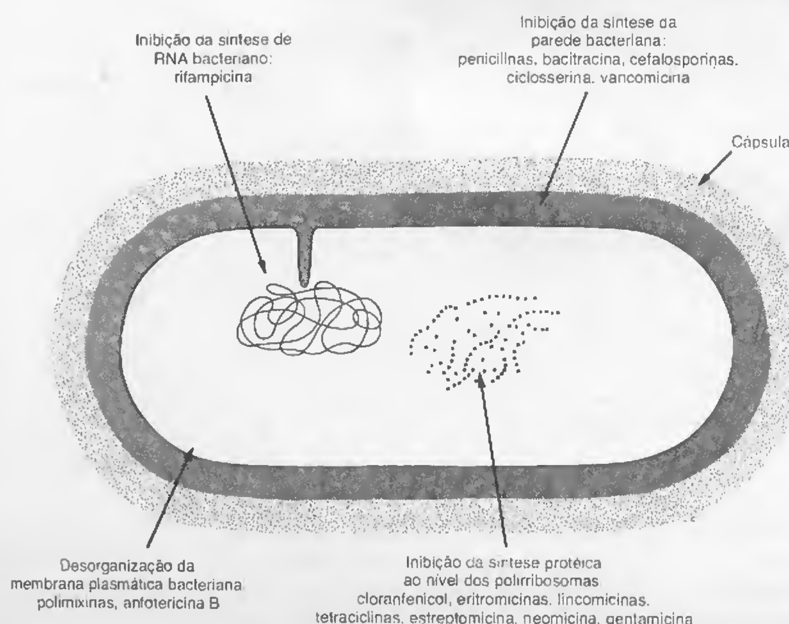


Fig. 14.9 Esquema mostrando alguns exemplos da ação de antibióticos sobre as bactérias. Embora o metabolismo das bactérias seja, em parte, semelhante ao das células eucariontes, algumas vias metabólicas são diferentes. O antibiótico ideal é aquele que inibe vias metabólicas próprias das bactérias, sem afetar muito o metabolismo das células eucariontes, que constituem o corpo do hospedeiro.

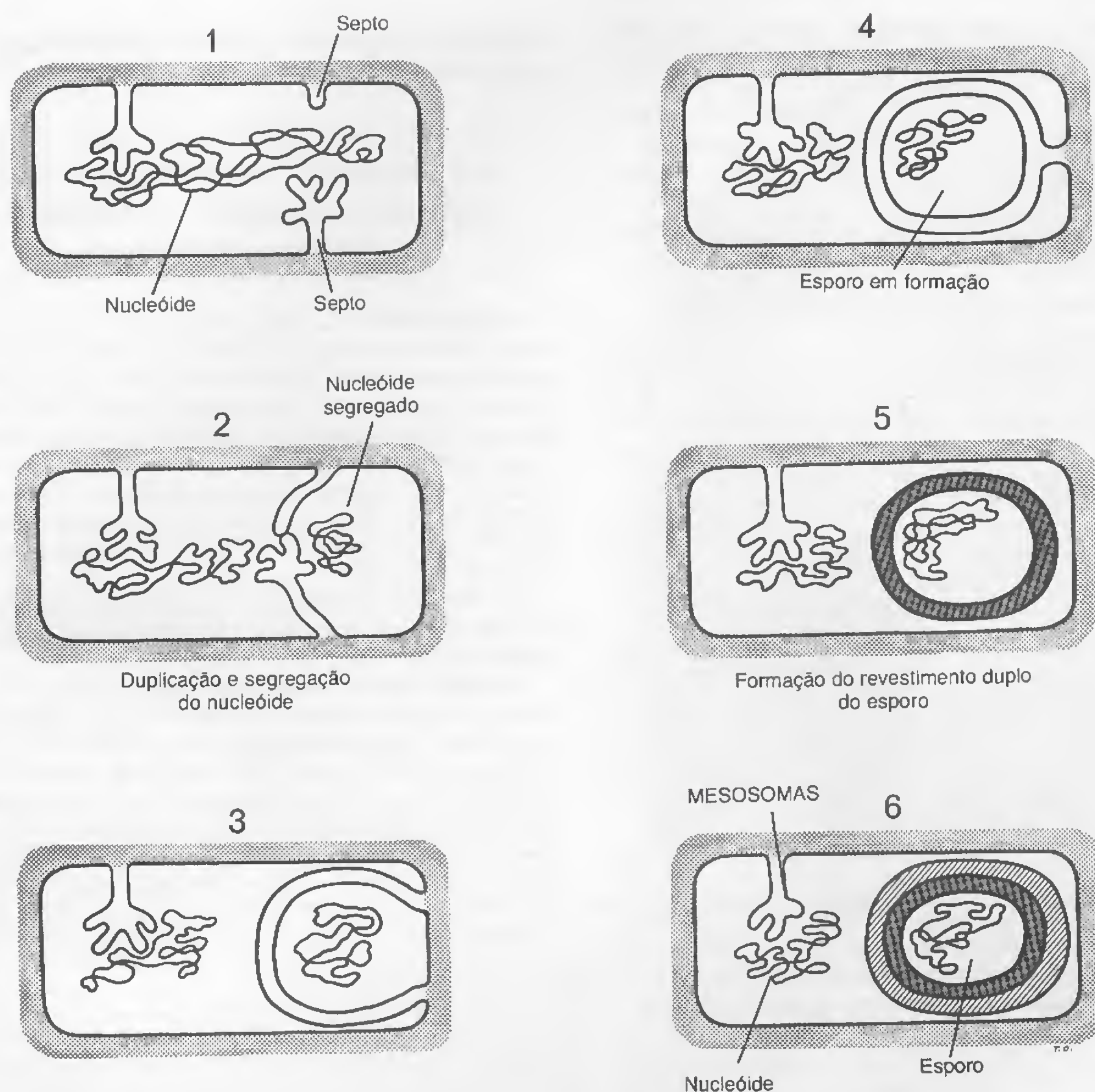


Fig. 14.10 Desenhos esquemáticos mostrando a formação dos esporos bacterianos. **1)** Fase inicial, quando se esboça a septação. **2)** A membrana plasmática se invagina, começando a isolar um nucleóide. **3-4)** Fases mais avançadas do esporo em formação, mostrando que um nucleóide já está isolado pela membrana. **5 e 6)** Formação do revestimento do esporo, que, depois, se separa dos restos da bactéria.

As bactérias se dividem sem mitose, pela formação de septos

A reprodução das bactérias é, via de regra, um processo rápido. Em condições ideais de cultura pode ocorrer uma divisão celular a cada 20 minutos. Portanto, uma única bactéria é capaz de dar origem a oito bactérias em apenas uma hora. Algumas bactérias, porém, têm um ciclo vital lento; o mais demorado é, provavelmente, o do *Mycobacterium leprae* (causador da lepra ou mal de Hansen), cuja duplicação dura cerca de 12 dias no seu *habitat* natural (lesão leprosa do paciente).

A síntese do DNA bacteriano se processa de modo semiconservador, como também acontece nas células eucariontes. À medida que o DNA do cromosoma original separa suas duas cadeias, cada uma delas serve como molde, isto é, como fonte de informação sobre a seqüência de bases para formação de novas cadeias de DNA. Os dois cromosomas resultantes têm, cada um, uma cadeia antiga e uma cadeia nova de DNA.

A divisão celular nesses seres se processa sem a presença de fuso mitótico, e a separação das células-filhas ocorre graças à formação de septos da parede (Fig. 14.12).

Além do DNA do nucleóide, as bactérias são portadoras de filamentos circulares de DNA, extracromosômicos, muito menores do que os cromosomas, também veiculando informação genética, e denominados **plasmídeos**.

Também nas células procariontes, como nas eucariontes, pode haver transferência de genes pelos **transposons**, que são segmentos de DNA dotados da capacidade de se transferirem entre



Fig. 14.11 Micrografia eletrônica mostrando diversas bactérias formando esporos (setas).

plasmídeos e cromosomas, "saltando" de um plasmídeo para outro ou de um plasmídeo para um cromosoma.

Com freqüência ocorre transferência de informação genética (DNA) de uma bactéria para outra

As bactérias estão sujeitas a mutações que alteram o seu genótipo. Além das mutações, outras transformações do genótipo podem ocorrer devido à transmissão de informação genética de uma bactéria para outra. Este processo faculta uma grande variação genética nas bactérias, combinando caracteres de várias raças ou linhagens, o que permite a sobrevivência das bactérias portadoras das melhores combinações de caracteres hereditários. Isto é, as bactérias cujo genoma lhes proporcionar um fenótipo mais adaptado ao meio sobreviverão melhor graças às forças de seleção natural.

A transmissão de informação genética entre bactérias é possível graças a três mecanismos: **transformação, conjugação** e **transdução** (Fig. 14.13).

Transformação. Este processo ocorre quando se adicionam a uma cultura de bactéria segmentos de DNA extraídos de outras bactérias, por processos químicos. Quando este tipo de experimento é feito em condições adequadas, observa-se que algumas bactérias da cultura adquirem características hereditárias derivadas da informação contida nos segmentos de DNA. Um caso clássico de transformação é o da experiência em que foi possível transformar bactérias avirulentas (incapazes de produzir doença) do gênero *Pneumococcus* em bactérias virulentas (capazes de causar doença), após a sua incubação em meio ao

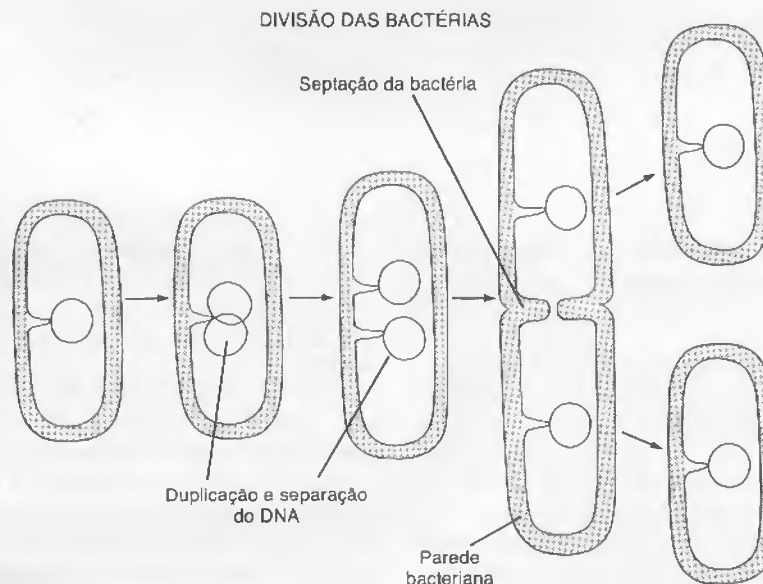


Fig. 14.12 Desenho esquemático ilustrando a divisão de uma célula bacteriana. Primeiro, ocorrem a multiplicação e a separação dos cromosomas e, posteriormente, invaginação da superfície bacteriana, com a formação da parede que vai separar as duas células-filhas.

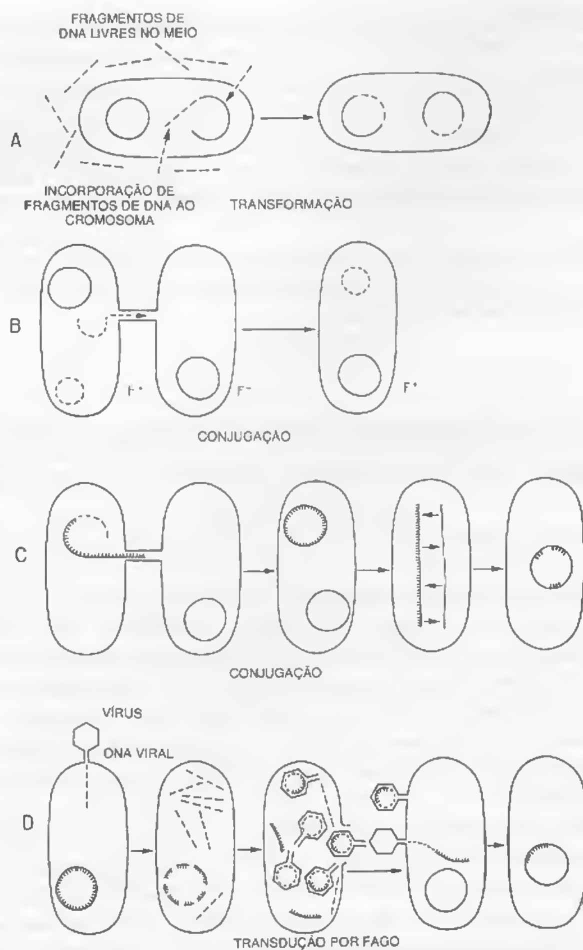


Fig. 14.13 Desenhos esquemáticos ilustrando as várias modalidades de transferência de DNA (informação genética) entre bactérias. Em **A**, o processo de transformação, onde fragmentos de DNA (tracejado), presentes no meio de cultivo, entram na bactéria e são incorporados ao seu genoma. Em **B**, um plasmídeo passa através de uma ponte (fímbria sexual), instalando-se em outra bactéria. É o processo de conjugação. Outro tipo de conjugação é mostrado no desenho **C**, onde um plasmídeo (tracejado), já incorporado ao nucleóide de uma bactéria, leva informação genética para o nucleóide de outra bactéria. Em **D**, um bacteriófago, depois de incorporar DNA bacteriano ao seu próprio DNA, transfere informação genética (DNA) do nucleóide de uma bactéria para o nucleóide de uma segunda bactéria. Esse processo chama-se transdução por fago.

qual foi adicionado DNA extraído de bactérias da linhagem virulenta (Fig. 14.13**A**). O processo de transformação apresenta as seguintes características:

a) As linhagens de bactérias doadoras e receptoras devem ser compatíveis, isto é, o processo não ocorre indiscriminadamente entre quaisquer bactérias.
b) O tamanho dos segmentos de DNA não deve ser menor que 1% do genoma da bactéria doadora. Abaixo deste tamanho não ocorre a transformação.
c) A adição da enzima DNAse ao meio digere as partículas de DNA, impedindo a transformação.
d) Pequena porcentagem das bactérias é suscetível à transformação e, mesmo assim, apenas durante uma fase de seu ciclo.

Desde a descoberta da transformação em *Pneumococcus*, vários outros tipos bacterianos mostraram essa mesma capacidade. Há indícios de que este tipo de transferência de material genético, descoberto em condições experimentais, pode ocorrer em condições de vida natural, sendo, portanto, um tipo de produção de novas linhagens de bactérias.

Conjugação. Este processo consiste na transmissão de informação genética através das fímbrias citoplasmáticas, que estabelecem conexões entre duas células bacterianas do mesmo gênero ou de gêneros diferentes.

A conjugação foi descoberta quando duas cepas de *Escherichia coli*, de constituições genéticas diferentes, foram cultivadas juntas, dando origem a bactérias híbridas (Fig. 14.13**C**). O estudo desse fenômeno mostrou que ele é insensível à adição de DNAse ao meio de cultura, o que eliminou a possibilidade de se tratar de uma transformação.

Na conjugação, a passagem de material genético se dá através das fímbrias, e uma das cepas transfere informação genética à outra. A cepa doadora contém no seu citoplasma um filamento de DNA, o fator F, que é um plasmídeo e, portanto, se duplica independentemente do DNA do nucleóide (Fig. 14.13**B**).

Após a descoberta do fator F, numerosos outros plasmídeos foram descritos, como os **fatores de transferência de resistência** ou **fatores R**, que transportam genes que tornam os seus portadores resistentes à ação de certos antibióticos.

Os plasmídeos R podem acumular informação genética, e um deles já foi descrito transportando genes que conferem à bactéria receptora resistência a sete antibióticos diferentes.

Transdução. É o processo pelo qual uma bactéria transmite informação genética a outra, usando como portador um vírus bacteriano (bacteriófago).

Durante o processo de formação dos bacteriófagos, podem ocorrer falhas que levem à produção de alguns bacteriófagos contendo parte do DNA do nucleóide da bactéria, em vez de terem somente DNA do bacteriófago (Fig. 14.13**D**).

Estes bacteriófagos defeituosos, contendo DNA bacteriano, irão injetar genes de uma bactéria dentro de outra, assim transferindo informação gênica. Posteriormente, o segmento de DNA da primeira bactéria é incorporado ao nucleóide da outra bactéria, sendo assim transmitido às células descendentes da célula receptora (Fig. 14.13**D**).

As bactérias se movimentam pela rotação de flagelos movidos por fluxo de prótons

Tanto estrutural como funcionalmente, os flagelos das células procariontes são completamente diferentes dos encontrados nas células eucariontes. Nas bactérias, os flagelos são organelas de locomoção medindo 3-12 μm de comprimento, ocos e com diâmetro de 12-30 nm (Fig. 14.6). Cada flagelo é uma estrutura rígida, apresentando na base um gancho que se introduz em orifícios de discos protéicos fixos localizados no envoltório (membrana plasmática e parede) da bactéria. Os discos protéicos atuam como "rolamentos" que facilitam o movimento rotatório do flagelo, ao mesmo tempo que servem de vedação para o conteúdo da bactéria. A parte final do gancho apresenta um "rotor" que é impulsionado por um gradiente de prótons que se forma através da membrana bacteriana. Quando o "rotor" gira, transmite seu movimento de rotação para o gancho e para o flagelo, pois

os três são partes de um conjunto único. Nesse caso, a energia para o movimento não é fornecida por ATP, mas diretamente pelo fluxo de prótons (v. Cap. 7).

Os flagelos bacterianos são dotados de movimento rápido de rotação, com cerca de 100 rotações por segundo, que impulsiona a bactéria na direção dos nutrientes (quimiotaxia positiva) ou em direção oposta às substâncias tóxicas (quimiotaxia negativa). As substâncias quimiotáticas agem sobre receptores situados na membrana da bactéria. O mecanismo pelo qual uma modificação no ambiente causa uma resposta no comportamento da bactéria é uma **transdução sensorial**. Este mecanismo é responsável pela quimiotaxia e também por outras respostas, como a **aerotaxia**, que é o movimento na direção de concentrações ótimas de oxigênio, e a **fototaxia** (movimento das bactérias fotossintéticas na direção da luz).

O flagelo das bactérias é um polímero de monômeros de **flagelina**, uma proteína com peso molecular de 40.000 dáltons. As flagelinas de bactérias diferentes não são exatamente iguais, apresentando diferenças na estrutura primária (composição e seqüência de aminoácidos). Os flagelos removidos experimentalmente, por agitação mecânica das bactérias, se refazem dentro de 3-6 minutos, tempo necessário para a síntese e agregação dos novos monômeros de flagelina. Como seria de esperar, os flagelos não se refazem quando a síntese protéica é inibida, como, por exemplo, pela adição do antibiótico cloranfenicol.

Micoplasma são as células procariontes mais simples

Os **micoplasmas** são bactérias muito pequenas, geralmente com 0,2 a 2 μm de tamanho, podendo apresentar-se com dimensão ainda menor. São as menores células conhecidas, e os menores micoplasmas (125 a 150 nm) são do tamanho dos maiores vírus. Seu limite externo é a própria membrana plasmática, pois os micoplasmas, ao contrário das outras bactérias, não possuem parede e, por isso, são pleomórficos (têm forma variável).

A estrutura dos micoplasmas é semelhante à das outras bactérias, exceto pela ausência de parede. Seu citoplasma apresenta grande quantidade de ribosomas, alguns vacúolos e grânulos. O teor de DNA de um micoplasma é aproximadamente 10 vezes menor em comparação com o da maioria das bactérias. Este DNA também se apresenta sob a forma de nucleóide, contendo cerca de 500.000 pares de nucleotídeos, o suficiente para codificar de 300 a 550 proteínas. Do ponto de vista bioquímico, os micoplasmas contêm os sistemas enzimáticos necessários para a glicólise, replicação de DNA, transcrição e tradução da síntese protéica.

Sabe-se pouco sobre a divisão dos micoplasmas. Enquanto alguns se reproduzem por fissão binária, parece que outros podem dividir-se por brotamento.

As cianobactérias ou cianofíceas ("algas azuis") são as bactérias fotossintéticas mais aperfeiçoadas

Além de clorofila, as cianobactérias possuem outros pigmentos denominados genericamente de **ficobilina**. Destas, a **ficocianina** (azul) e a **ficoeritrina** (vermelha) são as mais comuns e responsáveis pela variedade de cores encontradas nas cianobactérias. A estrutura das cianobactérias é, basicamente, a de uma bactéria, pois elas exibem parede celular, cápsula, nucleóide, ribosomas e inclusões de fosfato, proteínas e lipídios (Fig. 14.14).

Chama atenção o seu sistema fotossintético, formado por sacos membranosos, achatados e concêntricos, entre os quais se encontram grânulos de 40 nm de diâmetro, presos à parede externa dos sacos. Sabe-se que esses grânulos, os **cianosomas**, contêm ficocianina e ficoeritrina, ao passo que a estrutura membranosa contém clorofila e outros compostos do sistema de fotossíntese. A energia solar absorvida pela ficocianina e pela ficoeritrina é transferida para as membranas contendo clorofila, onde se realiza a fotossíntese. A ficocianina e a ficoeritrina aumentam o espectro de utilização da luz solar, em comparação com a absorção proporcionada pela clorofila sozinha.

Como nas demais bactérias, a divisão celular ocorre por crescimento e invaginação da parede celular. As cianobactérias não apresentam nem cílios nem flagelos; não obstante, graças a me-

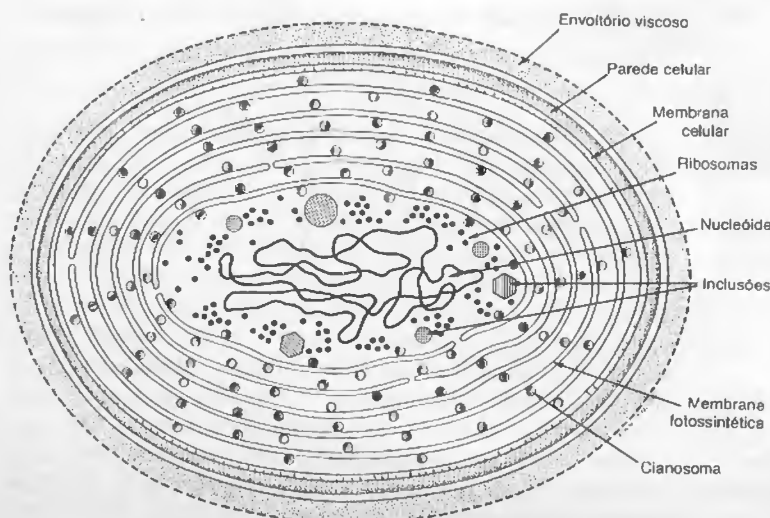


Fig. 14.14 Desenho esquemático da estrutura de uma cianobactéria. Observar o nucleóide central, envolto por camadas concêntricas de membranas do sistema fotossintético. As vesículas ou grânulos, denominados cianosomas, também fazem parte do sistema fotossintético dessa bactéria.

canismos desconhecidos, elas se movimentam por deslizamento e rotação.

Algumas cianobactérias, além de fotossintéticas, são capazes de reduzir nitrogênio para formar amônia (NH_3). Usando água, oxigênio, gás carbônico e a amônia, elas sintetizam grande variedade de moléculas orgânicas, sendo capazes de sobreviver com esses parcos recursos, nas condições mais adversas, desde que na presença da luz.

Sumário

As células procariontes constituem as bactérias. Provavelmente por não disporem do sistema de membranas internas, tão desenvolvido nas células eucariontes, as procariontes são sempre de menor tamanho.

Os vários tipos de bactéria apresentam grande diversidade metabólica, o que lhes permite viver nas condições ambientais mais variadas. Quanto à forma, podem ser esféricas, nos cocos*; alongadas nos* bacilos*; e helicoidais, nos* espirilos*. Aos pares, os cocos formam* diplococos*; em grupos irregulares, os* estafilococos*; e, quando dispostos em fileira, são chamados de* estreptococos.

O microscópio eletrônico mostra que a estrutura das bactérias é relativamente simples. O DNA é um filamento circular, de cadeia dupla, preso a uma dobra da membrana plasmática. No citosol existem polirribosomas, além de grânulos de depósito. Por fora da membrana plasmática encontra-se a parede, que é rígida, confere forma à célula e está presente em todas as bactérias, exceto nos micoplasmas. Mais externamente à parede, existe, em todas as bactérias, um material viscoso que, muito freqüentemente, se condensa para formar a cápsula bacteriana.

As paredes são de dois tipos básicos, facilmente identificáveis por coloração, o que permite a divisão das bactérias em dois grandes grupos: as bactérias Gram-positivas e as Gram-negativas. Somente as primeiras se coram em roxo pela técnica de coloração de Gram.

A superfície bacteriana pode apresentar prolongamentos de dois tipos: os flagelos *e as* fímbrias*. Os flagelos servem para a locomoção, são maiores do que as fímbrias e constituídos de monômeros da proteína* flagelina*. Os movimentos flagelares das bactérias utilizam a energia fornecida por um fluxo de prótons.*

As fímbrias comuns são curtas, finas e rígidas. As fímbrias sexuais *são maiores e servem de canais para a transferência unidirecional de DNA entre células bacterianas, no processo de conjugação.*

De acordo com seu metabolismo, as bactérias podem ser fototróficas, *quando utilizam a energia da luz solar para sintetizar moléculas orgânicas a partir de moléculas simples, e* quimiotróficas, *quando se nutrem de compostos químicos complexos já formados. Estas últimas podem utilizar compostos inorgânicos, quando são chamadas* quimiolitotróficas, *ou, então, exigir compostos orgânicos, sendo denominadas de* quimiorganotróficas.

Algumas bactérias, diante de condições adversas do ambiente, originam esporos, *que são extremamente resistentes às variações de temperatura e ao dessecamento.*

As bactérias se dividem por fissão da célula em duas, após duplicação do filamento circular de DNA. Muitas bactérias são portadoras de filamentos circulares de DNA menores, extracromosômicos, os plasmídeos.

Chama-se transformação *a passagem de fragmentos de DNA de uma bactéria para outra, através do meio de cultura. Adicionando-se DNAse (enzima que digere DNA) ao cultivo, não ocorre a transformação. A* conjugação *é a passagem direta de informação genética (DNA) de uma bactéria para outra através de túneis formados pelas fímbrias. Finalmente, na* transdução, *a informação genética é transferida de uma célula para outra através de vírus (bacteriófagos). Os bacteriófagos que se formam numa célula podem, acidentalmente, conter DNA da bactéria. Quando infecta outra bactéria, o bacteriófago transfere para o seu novo hospedeiro o fragmento de DNA trazido do hospedeiro anterior.*

As cianobactérias *são bactérias que possuem* ficoeritrina *e* ficocianina, *além de* clorofila. *Graças à presença destes três pigmentos, as cianobactérias são muito eficientes na absorção da radiação solar. A energia dos comprimentos de onda absorvida pela ficocianina (pigmento azul) e pela ficoeritrina (pigmento vermelho) é transferida para a clorofila, onde se completa a fotossíntese. Os pigmentos azul e vermelho estão contidos em grânulos separados, e a clorofila está ligada a membranas paralelas à membrana plasmática.*

Bibliografia

BALOWS, A. (ed.). *The Prokaryotes.* 4 volumes. Springer-Verlag, 1992.

BROCK, T. D. and MADIGAN, M. T. *Biology of Microorganisms.* 6th ed., Prentice-Hall, 1990.

DAVIS, B. D. *et al. Microbiology.* 4th ed., Lippincott, 1990.

SILVERMAN, M. and SIMON, M. I. Bacterial flagella. *Ann. Rev. Microbiol., 31*:397, 1977.

STAINER, R. Y. *et al. The Microbial World,* 5th ed., Prentice-Hall, 1986.

WARTH, A. D. Molecular structure of the bacterial spore. *Adv. Microb. Physiol., 17*:1, 1978.

15

Mecanismos de Regulação das Atividades Celulares: Como se Originam Algumas Doenças

Roteiro

- *Para o perfeito funcionamento das células, o organismo animal deve manter constante a composição do meio interno.*
- *No meio intracelular, as moléculas mais importantes, do ponto de vista funcional e estrutural, são os ácidos nucléicos e as proteínas.*
- *Defeitos na replicação do DNA, na sua transcrição para RNA e na tradução deste em proteínas podem causar doenças.*
- *Podem ainda ocorrer defeitos nas moléculas após a tradução (defeitos pós-traducionais).*
- *Os defeitos gênicos nas células germinativas se transmitem para as gerações futuras: transmissão vertical.*
- *Os defeitos gênicos nas células somáticas transmitem-se apenas para outras células do mesmo indivíduo: transmissão horizontal.*
- *Cada dia aumenta o número de doenças que podem ser explicadas em termos de biologia celular e molecular, o que facilita o diagnóstico e o tratamento.*
- *Alterações nas proteínas estruturais também podem causar doenças.*

Este capítulo visa dar uma visão panorâmica dos principais mecanismos que regulam as atividades celulares. Visa também dar uma idéia do crescimento acelerado do conhecimento desses mecanismos e do seu impacto sobre a formação de profissionais nas áreas biomédica e da saúde. Finalmente, introduzirá o leitor à noção de como a perturbação desses fatores, por agentes intrínsecos ou extrínsecos às células, podem gerar doenças.

É extremamente importante aos seres vivos a presença de mecanismos de ajuste às variações dos meios externo e interno, mantendo constantes os meios intra- e extracelular do organismo, dentro de limites pouco variáveis e compatíveis com a alta eficiência da maquinaria celular. A importância da manutenção do meio interno foi primeiro postulada por Claude Bernard, na segunda metade do século passado, e posteriormente desenvolvida por Walter B. Cannon, que criou o termo **homeostase** para designar a tendência dos organismos vivos em manter constante o meio interno. Quando o organismo não consegue manter a homeostase, ocorre a doença.

Os ácidos nucléicos e proteínas são as moléculas mais importantes nos processos vitais, e é fácil compreender o seu papel relevante na manutenção da homeostase e, portanto, da saúde. Os ácidos nucléicos armazenam, no núcleo celular, informação genética sob a forma de DNA e transmitem essa informação ao citoplasma pelos mRNAs. As proteínas desempenham relevante papel na atividade celular, pois são responsáveis pelas inúmeras reações enzimáticas e muitas têm papel estrutural. Há proteínas estruturais intracelulares, constituindo o citoesqueleto contrátil, e muitas outras (colágeno, elastina, fibronectina, laminina, osteonectina) exercem o papel estrutural no meio extracelular, onde criam condições adequadas para o funcionamento das células. Para que as enzimas possam funcionar eficientemente e reagir de modo adequado às variações dos meios interno e externo, desenvolveram-se, durante a evolução, complexos mecanismos de **regulação gênica** e **enzimática**, que permitem controlar a atividade das enzimas, adequando-as às necessidades do organismo. O conhecimento dos mecanismos regulatórios das atividades celulares é de grande importância não só na compreensão das doenças, como também para fornecer bases racionais para a sua terapêutica.

A Fig. 15.1 mostra uma visão panorâmica dos vários níveis nos quais, através dos ácidos nucléicos e proteínas, ocorre a regulação das atividades celulares. A análise dessa figura mostra que podem ocorrer alterações qualitativas e quantitativas nos genes. Também podem ocorrer alterações nos processos de replicação do DNA, na transcrição do DNA para RNA, na tradução do mRNA em proteína, além das alterações que podem acontecer após a tradução (alterações pós-traducionais).

A Tabela 15.1 mostra alguns exemplos do envolvimento de estruturas celulares, como microtúbulos, mitocôndrias, peroxissomas e DNA cromossômico, no aparecimento de diversas doenças.

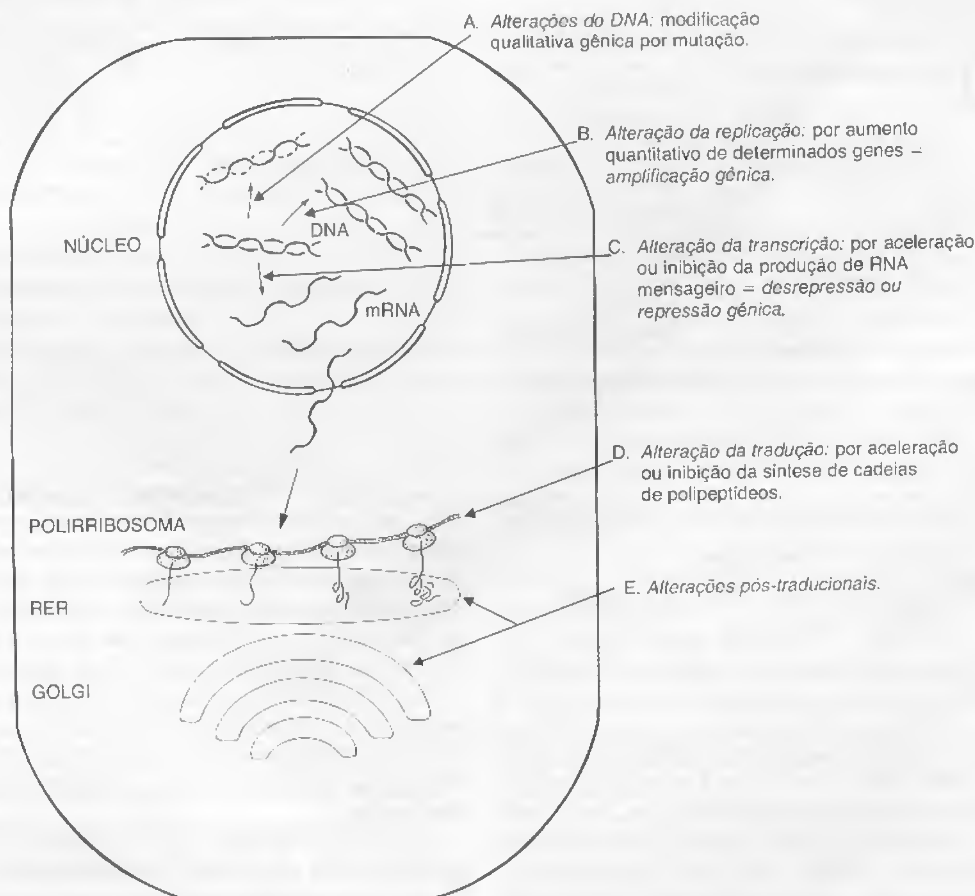


Fig. 15.1 Visão geral da gênese dos principais mecanismos de regulação da atividade celular, e cujas alterações levam freqüentemente a doenças.

Tabela 15.1 Ilustrando doenças devido a alterações em vários componentes celulares*

Componente celular envolvido	Doença	Causa	Alteração celular visível	Aspectos clínicos
Microtúbulo	Doença de Kartagener	Ausência de dineína nos microtúbulos	Ausência de braços nos microtúbulos dos cílios e flagelos	Esterilidade (masculina) e infecção respiratória crônica por imobilidade dos cílios e flagelos
Microtúbulo	Diabete no roedor *Acomys*	Ausência de microtúbulos citoplasmáticos nas células produtoras de insulina	Com exceção dos microtúbulos, o aspecto da célula é normal	Aumento da taxa de glicose no sangue (diabete) devido à não-secreção da insulina sintetizada
Mitocôndria	Citopatia mitocondrial	Desacoplamento da oxidação fosforilativa	Forma e quantidade alteradas das mitocôndrias	Metabolismo basal elevado, emagrecimento
Peroxisoma	Síndrome cérebro-hepatorrenal (Zellweger)	Mutação da enzima peroxisômica	Ausência de peroxisomas no fígado e rim	Retardamento psicomotor, disfunção do fígado e lesão renal
Lisosoma	Leucodistrofia metacromática (lipoidose)	Ausência de sulfatase lisosômica	Acúmulo de lipídios nas células	Retardamento mental e psicomotor
Lisosoma	Doença de Hurler	Ausência de L-iduronidase lisosômica	Acúmulo de dermatan-sulfato em células	Retardamento mental e do crescimento
DNA cromosômico	*Osteogenesis imperfecta*	Mutação de gene do colágeno	Alteração das fibras colágenas	Fraturas freqüentes devido à síntese defeituosa de fibras de colágeno
Retículo endoplasmático rugoso	Escorbuto	Carência de vitamina C, co-fator necessário para a síntese de colágeno	Alteração das fibras colágenas	Hemorragias freqüentes e queda de dentes devido à síntese defeituosa de colágeno
Complexo de Golgi	Doenças das células I	Ausência da enzima que fosforila as enzimas lisosômicas	Acúmulo de inclusões nos fibroblastos	Crescimento e desenvolvimento mental retardados
Complexo de Golgi e grânulos de secreção	Diabete pró-insulínica	Não-transformação pró-insulina em insulina nos grânulos de secreção	—	Diabete devido à falta de insulina no sangue

*Todas as doenças apresentadas, com exceção do diabete do roedor *Acomys*, são humanas.

Alterações qualitativas e quantitativas do DNA regulam atividades fisiológicas, mas podem causar doenças

A constância qualitativa e quantitativa do DNA é característica importante, e, para que isto aconteça, é necessário que os processos de replicação ocorram com fidelidade. Isto, porém, não acontece sempre, e alterações do DNA podem causar doenças. Mas é preciso lembrar que o DNA não é tão estável quanto se acreditava até há alguns anos e que essa discreta instabilidade tem grande significado evolutivo, pois a evolução é um processo muito lento e pode se aproveitar das raras modificações que podem ter lugar no DNA.

O DNA pode sofrer **alterações qualitativas** devido a mutações, que podem ser espontâneas ou provocadas. As mutações, quando ocorrem na linhagem das células germinativas (ovócitos e espermatozóides), podem gerar as **doenças hereditárias,** como, por exemplo, a hemofilia do tipo B, distrofia muscular de Duchenne e neurofibromatose. Nesses casos, diz-se que a transmissão do defeito gênico se dá em **direção vertical.** Quando a alteração do DNA ocorre em células somáticas, causam doenças não-hereditárias. Vários tipos de câncer são considerados como causados por uma ou mais mutações de células somáticas. Nesses casos diz-se que a transmissão do efeito gênico é **horizontal.**

As mutações podem agir diretamente sobre a seqüência de bases no DNA que, então, codificará uma proteína deficiente. Podem, também, afetar as seqüências de bases no DNA que codificam as enzimas responsáveis por modificações pós-traducionais de certas proteínas. Como essas enzimas são muito numerosas, a probabilidade de aparecerem doenças devidas a

mutações que afetam o acabamento pós-traducional das proteínas é muito grande.

Admite-se, atualmente, que alterações gênicas são responsáveis por aproximadamente 5% das doenças conhecidas. Essas alterações gênicas seriam responsáveis por 50% das malformações embrionárias que ocorrem, na espécie humana, em 3% dos nascimentos. Além de alterações gênicas por mutações localizadas na seqüência do DNA, também podem ocorrer deleções ou acréscimos em cromossomas inteiros, ou em partes de cromossomas (defeitos cromossômicos). Essas alterações cromossômicas são visíveis ao microscópio óptico. A Tabela 15.1 ilustra alguns casos de doenças causadas por defeitos nos cromossomas.

Além dos casos já mencionados, ocorrem modificações de DNA que podem transferir-se de um cromossoma para outro (translocações), processos esses responsáveis por algumas doenças. Um exemplo bem ilustrativo é o linfoma de Burkitt, tumor maligno do tecido linfático. Nessa doença, ocorre translocação do oncogene c-myc do cromossoma 8 para o 14. O oncogene c-myc se insere no cromossoma 14, próximo a uma seqüência de DNA fortemente ativador (promotor), levando o oncogene a se expressar intensamente, o que estimula a multiplicação anômala das células linfóides. As **alterações quantitativas** do DNA são exemplificadas nos processos de **amplificação gênica** que ocorrem normalmente na natureza (v. Cap. 9), ou então podem processar-se por ação de agentes externos.

Amplificação gênica consiste no aumento considerável (pode chegar até 1.000 vezes) do número de determinadas seqüências gênicas, normalmente existentes com apenas poucas cópias no genoma. Como exemplos de genes normalmente amplificados, podem ser citados os pufes de DNA dos cromossomas de certos insetos dípteros e os genes para as histonas e para os rRNAs.

O caso mais bem conhecido de amplificação gênica por agente externo é aquele induzido pela droga anticancerosa metotrexato, que amplifica o gene da **hidrofolato redutase,** enzima que participa da síntese do DNA e que é inibida pelo metotrexato. Esse fenômeno, observado também em cultura de tecidos, com várias outras drogas, tem importância médica, pois explica a resistência que certos pacientes desenvolvem a determinadas drogas após a primeira série do tratamento.

A amplificação de um oncogene existente na célula pode ser a causa de um tumor, como ocorre no neuroblastoma, tumor no qual foi descrita uma forte amplificação do oncogene N-myc.

Até 1983 foram descritas ao redor de 4.000 doenças hereditárias (v. Mc KUSICK, V. A. *Mendeliam Inheritance in Man.* Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1983). Como os seres humanos têm, segundo estimativas conservadoras, no mínimo 50.000 a 100.000 genes e como um mesmo gene pode apresentar mais de um defeito, dependendo do local afetado na sua cadeia de nucleotídeos, percebe-se que a estatística de McKusick é apenas a ponta do *iceberg*.

O processo de replicação do DNA é muito preciso, mas pode gerar doenças se os poucos erros cometidos não forem corrigidos

No Cap. 8, foram citados mecanismos pelos quais os erros de replicação são corrigidos, visando obter a alta fidelidade necessária para a estabilização das espécies. Esses mecanismos, de maneira geral, efetuam a reparação da grande maioria dos defeitos que ocorrem na replicação.

Porém, falhas nesses mecanismos de reparação podem produzir doenças, e delas a mais conhecida é o *xeroderma pigmentosum*. Esta doença é autossômica e recessiva, e é caracterizada por alta sensibilidade aos raios UV acompanhada de aumento considerável da incidência de câncer de pele.

Alterações na tradução são pouco conhecidas

O processo de tradução é bastante complexo e depende de diversos componentes celulares, dos quais os mais importantes são o rRNA, mRNA, tRNA e o retículo endoplasmático rugoso. A perda dos ribosomas é um sinal precoce, inespecífico, de degeneração celular provocada por inúmeros agentes tóxicos e causa, certamente, uma lesão na tradução.

Muitas proteínas, após a síntese das cadeias de aminoácidos, passam por inúmeras modificações pós-traducionais

Além de algumas proteínas simples, as proteínas conjugadas (glicoproteínas, lipoproteínas etc.) passam por importantes modificações pós-traducionais que são freqüentemente complexas, como já foi analisado no Cap. 10 a respeito dos processos de glicosilação, fosforilação, sulfatação e proteólise limitada. Estes processos, responsáveis pela diversidade estrutural e funcional das proteínas, quando perturbados geram inúmeras doenças. Como exemplo pode ser citado o colágeno, que tem uma patologia excepcionalmente rica, não só porque existem vários genes responsáveis pela síntese de seus vários tipos (ao redor de 12), mas também porque, após a sua tradução, alguns tipos de colágeno passam por quase uma dezena de modificações, a maioria delas dependentes de atividade enzimática. Assim é que a molécula de colágeno passa por processos pós-traducionais de hidroxilações, glicosilações, oxidações e proteólises limitadas que ocorrem dentro das células que sintetizam colágeno e, também, no meio extracelular.

Essa complexidade de alterações pós-traducionais explica a patologia rica e variada do colágeno, exemplificada pelas síndromes de Ehlers-Danlos, da qual são conhecidos, no momento, oito tipos. O mecanismo molecular de algumas dessas síndromes já é bem conhecido.

Outro exemplo é a doença das células I (*inclusion cell disease*), cujos enfermos apresentam células com inclusões citoplasmáticas, nanismo e retardamento mental. Como foi visto no Cap. 10, ela é causada por deficiência da enzima responsável pela fosforilação de glicoproteínas no aparelho de Golgi, fosforilação esta essencial na síntese de enzimas lisosômicas.

Os processos de regulação das atividades gênicas e enzimáticas são de grande importância para a homeostase

A regulação das atividades gênicas e enzimáticas foi tratada nos Caps. 3 e 9, e por elas se percebe a importância de moléculas informacionais nestes processos. Estas moléculas são de natureza variada, podendo ser hormônios protéicos, esteróides, fatores de crescimento, metabólitos e íons (como o Na^+, K^+ e Ca^{2+}). Como seria de esperar, o funcionamento defeituoso destes inúmeros e complexos sistemas reguladores é causador de uma rica patologia. É interessante observar que, quando um parâmetro fisiológico é de grande importância para a homeostase, ele é freqüentemente regulado por mais de um mecanismo, assegurando assim um controle mais eficiente. É o caso, por exemplo, da regulação do teor de cálcio e de glicose no sangue, que são controlados cada um por dois hormônios de ação antagônica, a saber: **calcitonina** e **paratormônio,** para o cálcio, e **insulina** e **glucagon,** para a glicose. A calcitonina faz a concentração de cálcio baixar no sangue, enquanto o paratormônio tem efeito oposto. Quanto à concentração sangüínea de glicose (glicemia), ela é elevada pelo glucagon e reduzida pela insulina.

Defeitos nas proteínas estruturais também podem causar doenças

Se bem que se tenha dado, neste capítulo, maior ênfase às enzimas na gênese das doenças, as proteínas estruturais defeituosas, por deficiência gênica ou agressão ambiental, também causam doenças. A seguir serão mencionados alguns exemplos bem estudados.

Um deles refere-se a um tipo de diabete descrito no roedor *Acomys* devido à carência de microtúbulos citoplasmáticos nas células produtoras de insulina. Como foi visto no Cap. 10, os microtúbulos são importantes para o transporte intracitoplasmático dos grânulos de secreção e, quando ausentes, impossibilitam a secreção de insulina pelas células β das ilhotas, gerando o diabete.

O escorbuto, causado por carência de ácido ascórbico (vitamina C), é caracterizado por lesão de colágeno, e ocorre porque essa vitamina é um co-fator necessário à síntese das fibras colágenas.

Doenças podem ser causadas por defeitos na síntese ou na degradação de componentes celulares

Processos defeituosos de degradação dos componentes celulares, processos estes essenciais para a renovação e que ocorrem em todos os componentes celulares, com exceção do DNA, podem, também, levar a uma série de doenças. Como a degradação das macromoléculas celulares ocorre em grande parte nos lisosomas, as doenças por falta de enzimas lisosômicas são as mais bem estudadas. As doenças lisosômicas mais conhecidas resultam da degração incompleta das glicosaminoglicanas, chamadas de **mucopolissacaridoses** (mucopolissacarídeo é o termo antigamente usado para as glicosaminoglicanas), e dos glicoesfingolipídios, chamadas de **lipoidoses** (lipóides, antigo nome para glicoesfingolipídios). Nessas doenças, a digestão das respectivas moléculas é incompleta, resultando no acúmulo intracelular dos produtos não digeridos completamente. Esse acúmulo ocorre em diferentes células, como, por exemplo, nas células do sistema nervoso, fígado, músculos, macrófagos e leucócitos. Em muitas dessas doenças, já se conhece a enzima defeituosa, o que abre a perspectiva da sua cura quando as técnicas de transferência gênica, já utilizadas em animais, puderem ser aplicadas à espécie humana.

Tabela 15.2 Exemplo de algumas alterações cromosômicas que levam a doenças no homem

Tipo de cromosoma	Tipo de lesão	Doença causada	Sintomas principais
AUTOSOMA	Presença de um cromosoma 21 a mais (trisomia)	Doença de Down (mongolóide)	Retardamento mental. Faces características
	Perda de parte de um dos cromosomas 22 (deleção parcial)	Meningioma benigno (tumor)	Tumor dos envoltórios do sistema nervoso central (meninges)
	Perda total de um dos cromosomas 22 (deleção total)	Meningioma maligno	Observe que o grau de alteração do cromosoma influi na agressividade do tumor
CROMOSOMA SEXUAL	Presença de um cromosoma X a mais	Síndrome de Klinefelter	Atrofia testicular. Retardamento mental. Aspecto físico feminino
	Presença de três ou quatro cromosomas X	Multiplicidade dos cromosomas X	Retardamento mental. Menstruações irregulares. Fertilidade preservada
	Ausência ou lesão de um dos dois cromosomas X	Síndrome de Turner	Aspecto feminino. Estrutura baixa. Infertilidade

Sumário

As células eucariontes apresentam complexos e sensíveis mecanismos que regulam suas atividades. Os ácidos nucléicos e proteínas, devido à sua alta diversidade estrutural e funcional, desempenham papel de relevância nesses mecanismos. Conseqüentemente, as alterações qualitativas e quantitativas nos ácidos nucléicos se refletem, diretamente, na produção de proteínas através dos processos de replicação, transcrição e tradução. Após a tradução, que ocorre nos polirribosomas, os processos de modificações pós-traducionais das proteínas, que se processam principalmente no retículo endoplasmático rugoso e no aparelho de Golgi, contribuem muito para a diversificação estrutural e funcional das proteínas. Alterações nos ácidos nucléicos e nas proteínas enzimáticas e estruturais são as causas de grande número de doenças já conhecidas, número este que aumenta em ritmo crescente. Quando certos parâmetros celulares são de importância fundamental para a manutenção da homeostase, as células geralmente têm mais de um mecanismo de regulação, garantindo assim um controle mais sensível e preciso das atividades celulares. Além das múltiplas doenças causadas por defeitos na síntese dos ácidos nucléicos e proteínas, ocorrem também doenças causadas por alterações na degradação de macromoléculas, o que se processa normalmente na maioria dos componentes celulares. Várias doenças são devidas a alterações localizadas nas organelas celulares e, freqüentemente, além de modificações bioquímicas, são acompanhadas por alterações morfológicas destas estruturas.

Bibliografia

KAPLAN, J. C. et DELPECH, M. *Biologie Moléculaire et Medicine*, Flammarion, 1990.
LEDER, P.; CLAYTON, D. A. and RUBENSTEIN, E. *Introduction to Molecular Medicine*. Sci. Am. Books, 1994.
MURRAY, R. K. *et al. Harper's Biochemistry*. 22nd ed. Appleton & Lange, 1990.
PEREZ-TAMAYO, R. *Mechanism of Disease*. Year Book Medical Pub., 1985.
RUBIN, E. and J. FARBER. *Pathology*. Lippincott, 1988.
TRENT, R. J. *Molecular Medicine. An Introduction Text for Students*. Churchill Livingstone, 1993.
UNDERWOOD, J. C. E. *General and Systematic Pathology*. Churchill Livingstone, 1992.

16

Os Vírus e suas Relações com as Células

Roteiro

- *O genoma do vírus pode ser de RNA ou de DNA. Num determinado vírus, só existe um desses dois tipos de ácido nucléico.*
- *Os vírus podem ser cultivados em embriões de galinha e em culturas de células animais ou vegetais.*
- *A partícula viral completa chama-se vírion, e é constituída de pequena variedade de macromoléculas.*
- *Cada vírion apresenta capsômeros protéicos e o genoma de RNA ou DNA.*
- *Certos vírus possuem um invólucro, contendo componentes das células hospedeiras.*
- *Os vírions apresentam simetria helicoidal ou icosaédrica.*
- *Os poxvírus (vírus da varíola e da vacina) são mais complexos e de estrutura ainda não totalmente esclarecida.*
- *Os viróides são constituídos apenas pelo genoma de RNA, sem capsômeros ou qualquer outra proteção.*
- *Os vírus que se multiplicam nas bactérias são chamados bacteriófagos ou, simplesmente, fagos.*
- *Foi mais fácil estudar a multiplicação dos bacteriófagos e só posteriormente foi elucidada a multiplicação dos vírus animais e vegetais.*
- *Alguns vírus são cancerígenos.*

Os vírus se multiplicam usando a maquinaria de síntese das células por eles parasitadas

No fim do século passado e início deste, quando a bacteriologia atravessava uma fase de grande progresso, descobriu-se que certas doenças das plantas e dos animais eram causadas por agentes infectantes, capazes de atravessar filtros que não deixavam passar bactérias.

A primeira observação nesse sentido foi feita por Dimitri Ivanovsky, em 1892, ao descobrir que a doença **mosaico do tabaco**, que ataca o arbusto do fumo, podia ser reproduzida experimentalmente pela inoculação, em plantas sadias, de um filtrado de folhas de plantas doentes.

Alguns anos depois, estes agentes patogênicos foram denominados **vírus filtráveis**, ou simplesmente **vírus**. Reconheceu-se que, além de produzirem nos hospedeiros lesões específicas, os vírus não proliferam nos meios de cultivo para bactérias e são invisíveis ao microscópio óptico.

Embora desde as primeiras observações vários pesquisadores tivessem admitido que os vírus são partículas, esta noção não foi imediatamente aceita por todos. Muitos acreditavam em um agente contagiante líquido que passaria pelos filtros.

Quando se conseguiu produzir filtros de colódio, com poros de dimensões conhecidas, foi possível provar, em definitivo, que os vírus são partículas menores do que as bactérias. Verificou-se, por esse processo, que as partículas viróticas medem cerca de 10 a 300 nm.

Em 1935, Wendel Stanley obteve o vírus do mosaico do tabaco em estado cristalino. Diversos outros vírus foram também cristalizados e, assim, estudados pelas técnicas de difração dos raios X e microscopia eletrônica. Graças a essas técnicas, descobriram-se a forma e a estrutura interna de muitos vírus e mostrou-se, definitivamente, que eles não são formados por células.

Cada partícula de um vírus, quando completa e dotada da capacidade de invadir a célula hospedeira, é chamada **vírion**. Como será visto depois, os vírus podem existir, também, sob as formas **vegetativa** e de **profago**, não-infectantes por serem incompletas.

Fora das células, o vírion é um pequeno conjunto de moléculas, podendo até ser cristalizado. Portanto, enquanto livre não pode ser considerado um ser vivo, pois não tem metabolismo, não cresce e não se multiplica. Entretanto, ao penetrarem na célula hospedeira, os vírions multiplicam-se e se comportam como seres vivos.

Por serem invisíveis ao microscópio óptico, nos estudos iniciais os vírus foram identificados por sua capacidade de causar doenças nos animais e nas plantas, e por seu parasitismo intracelular obrigatório. Todavia, há bactérias que também são parasitas intracelulares e não crescem nos meios de cultivo (rickéttsias). As menores dentre estas bactérias são do tamanho de certos vírus. Assim, nem a obrigatoriedade do parasitismo intracelular, nem o tamanho extremamente reduzido são características exclusivas dos vírus.

Os vírus caracterizam-se principalmente por apresentarem organização estrutural simples, em comparação com as células. Os vírions são constituídos basicamente de um genoma (DNA ou RNA) envolvido por uma ou mais camadas protetoras. Esse genoma é mínimo, contendo apenas poucos genes, mas é capaz de redirecionar o metabolismo das células invadidas para produzir ácidos nucléicos e proteínas virais. O genoma viral carrega também informações para os mecanismos que permitem aos novos vírions saírem da célula infectada. O genoma viral pode ser formado de DNA ou RNA, em cadeia simples ou dupla, enquanto, nas células, o genoma é sempre de DNA em cadeia dupla. Sua simplicidade é tão acentuada que os vírions contêm exclusivamente DNA ou RNA, e nunca estes dois tipos de ácidos nucléicos estão presentes no mesmo vírion. Os vírions não contêm sistemas para utilizar energia, nem a maquinaria sintética (enzimas, ribosomas, tRNA, mRNA etc.) necessária para a formação de novos vírions. Eles dependem das macromoléculas, da energia e da organização celular para se multiplicarem.

A multiplicação dos vírus é feita através de um processo que pode ser explicado em duas etapas: na primeira, as organelas da célula parasitada fabricam as partes constituintes dos vírions; na segunda, estas partes juntam-se para formar os vírions (montagem). Mesmo as células mais rudimentares multiplicam-se por crescimento e divisão da própria célula.

Há **vírus animais** (Fig. 16.1), **vegetais** e **bacteriófagos**, assim denominados por parasitarem células animais, vegetais e bacterianas, respectivamente. Existe grande especificidade entre o vírus e a célula parasitada. Por exemplo, o vírus da raiva e da poliomielite parasitam exclusivamente células nervosas.

O cultivo de vírus só pode ser feito em células vivas

O cultivo dos vírus é dificultado pelo fato de que eles só se multiplicam no interior de células vivas, pois não possuem as

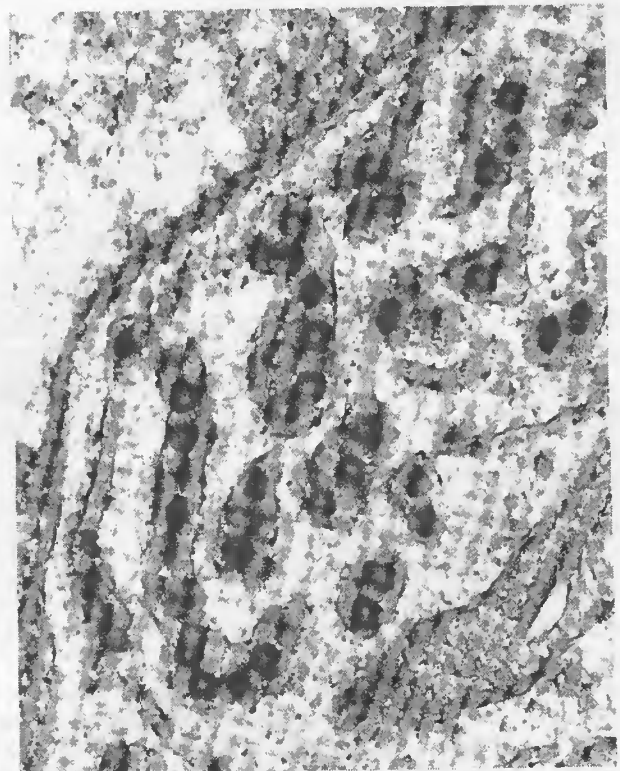


Fig. 16.1 Micrografia eletrônica de célula humana tumoral (câncer), contendo partículas virais dentro das cisternas do retículo endoplasmático.

organelas necessárias à síntese de macromoléculas. Atualmente os vírus são cultivados de três maneiras:

1. em animais, plantas ou bactérias sensíveis, cujas células são parasitadas;
2. em embriões de galinha; e
3. em culturas de células.

A inoculação em animais ou plantas foi a primeira técnica utilizada para o estudo experimental dos vírus e apresenta inconvenientes óbvios. Por isso é usada para o estudo de alguns vírus que não crescem nos embriões de galinha e nas culturas de células.

O cultivo de vírus em embriões de galinha é uma técnica fácil e econômica para certos grupos de vírus. A inoculação, conforme o vírus que se deseja cultivar, pode ser feita na membrana corioalantóide ou em outros anexos embrionários.

O aperfeiçoamento das técnicas de cultivo em células veio trazer nova contribuição ao estudo dos vírus. As células cultivadas são muito mais sensíveis aos vírus do que enquanto fazem parte do corpo de um animal. Por exemplo, o vírus da poliomielite, quando infecta o homem, não ataca os rins, mas se multiplica muito bem em cultura de células renais de primatas.

Em geral, a proliferação dos vírus nos cultivos de células é acompanhada através das alterações que os vírus causam nas células e que podem ser detectadas com facilidade no microscópio óptico comum, alterações estas chamadas **efeito citopático**.

Os vírus vegetais são muito estudados através da inoculação em plantas. Todavia, esta técnica não se presta a estudos quantitativos mais precisos, e a virologia vegetal ressentia-se da falta de um sistema de cultivo de tecido como o de que dispõe a virologia animal, em que milhões de células podem ser infectadas ao mesmo tempo e os eventos subseqüentes podem ser seguidos com facilidade. Mais recentemente se têm usado protoplastos de células foliares, obtidos pela digestão da parede celular com pectinase e celulase. As células vegetais sem paredes, e em suspensão, podem ser então infectadas pela simples adição de uma suspensão viral no meio de cultura.

Os vírus que atacam as células bacterianas são, naturalmente, estudados em culturas de bactérias.

A composição química dos vírus é muito simples (pequena variedade de moléculas)

Os vírus são constituídos basicamente por proteínas e ácidos nucléicos, e alguns contêm pequenas quantidades de outros compostos.

A variedade de moléculas protéicas presentes em um vírus é sempre muito restrita, e alguns possuem apenas um tipo de proteína. Mas as proteínas são moléculas antigênicas, isto é, capazes de estimular as defesas do organismo invadido e a formação de anticorpos, sendo por isso importantes para a fabricação de vacinas usadas na imunização do homem e dos animais, protegendo-os das doenças produzidas pelos vírus.

As proteínas virais têm várias funções, como proteger o genoma e facilitar sua transferência de uma célula hospedeira para outra. Elas auxiliam a aderência dos vírus às células sensíveis. Como será visto adiante, as proteínas são as macromoléculas responsáveis pela forma das partículas virais.

As características antigênicas dos vírus são devidas a suas proteínas. O sistema imunitário dos animais hospedeiros reconhece como estranhas as proteínas virais e organiza as defesas em resposta aos vírus invasores, tentando destruí-los.

Conforme já foi mencionado, os vírus contêm apenas um tipo de ácido nucléico, RNA ou DNA, que codifica a informação genética essencial para a multiplicação do vírus. Este genoma pode ser um filamento único ou duplo e pode ser linear ou circular.

Na maioria dos vírus com genoma de DNA, este se apresenta como uma hélice dupla. Já o genoma de RNA ocorre freqüentemente como um filamento único. DNA em filamento simples e RNA em filamento duplo aparecem como exceções.

O peso molecular dos ácidos nucléicos dos vírus varia entre $1,7 \times 10^6$ até 240×10^5. O número de polipeptídeos que podem ser codificados por um vírus depende, obviamente, do tamanho do seu ácido nucléico.

Além do ácido nucléico do genoma (RNA ou DNA) e das proteínas dos capsômeros (ver adiante), alguns vírus saem da célula hospedeira com um invólucro derivado do envoltório nuclear ou da membrana plasmática. Como as membranas celulares das quais derivam, o invólucro viral é uma bicamada lipídica com proteínas inseridas, formando um mosaico fluido. Os lipídios são os mesmos das membranas celulares, mas as proteínas são principalmente glicoproteínas codificadas pelo genoma viral. Estas glicoproteínas têm a função de fixar os vírions a proteínas específicas da membrana celular, tornando possível a propagação da infecção viral.

Os vírus com invólucro lipoprotéico são inativados, isto é, perdem a virulência, quando tratados por éter ou outro solvente de lipídios.

Enzimas viróticas

Alguns vírus possuem enzimas. Os *mixovírus* e os **paramixovírus** contêm **neuraminidase** em sua superfície. Esta enzima libera **ácido neuramínico (ácido siálico)** das glicoproteínas do glicocálice e da secreção mucosa que cobre a superfície do epitélio das vias respiratórias e do tubo digestivo. É provável que a neuraminidase facilite a penetração desses vírus nas células hospedeiras. Mixovírus e paramixovírus (*mixo*, muco) possuem afinidade pelas células cobertas por muco.

Certos vírus com genoma de RNA, como, por exemplo, os mixovírus e o vírus da estomatite vesicular, contêm pequena quantidade de uma polimerase que copia RNA formando outra molécula de RNA, obviamente complementar da primeira, que foi introduzida na célula pelo vírus. Nestes casos, a **RNA-polimerase dependente de RNA**, transportada pelo vírus, é essencial para iniciar a replicação do genoma viral, pois, nas células, o fluxo de informação é sempre no sentido de DNA para RNA, não existindo na célula hospedeira enzima para a cópia de RNA a partir de outra molécula de RNA (ver adiante, neste mesmo capítulo).

Os vírus que possuem envelopes formados por fragmentos de membranas da célula hospedeira podem carregar enzimas normalmente presentes nessas membranas. Neste caso, as enzimas não são específicas do vírus, mas da célula hospedeira.

Na cauda dos bacteriófagos da série T-par (T_2, T_4, T_6) da *Escherichia coli* existem ATP e ATPase, sistema que deve fornecer a energia para contração da bainha que envolve a cauda. Essa contração injeta o DNA do bacteriófago na *Escherichia coli* (ver adiante). Estes mesmos fagos contêm **lisozima**, enzima que rompe as ligações entre o ácido N-acetilmurânico e a N-acetilglicosamina, existentes na parede da *Escherichia coli*, facilitando a infecção da bactéria pelo fago.

Na maioria dos vírus, os capsômeros formam uma hélice ou um icosaedro. Alguns vírus apresentam invólucro

A morfologia externa e a estrutura interna dos víriоns são estudadas principalmente pelas técnicas de difração de raios X e de microscopia eletrônica, de preparados sombreados, ou "corados" negativamente (v. Cap. 2).

Como será visto a seguir, a maioria dos víriоns exibe uma **simetria helicoidal** (Fig. 16.2), ou um tipo especial de simetria cúbica denominada **simetria icosaédrica** (Figs. 16.3 e 16.4).

Os víriоns são constituídos por um **capsídeo**, formado por **capsômeros**, que envolve e protege o genoma (RNA ou DNA), recebendo o conjunto o nome de **nucleocapsídeo**.

Víriоns helicoidais

Dentre os vírus cujas partículas infectantes apresentam simetria helicoidal, o mais bem estudado é o do mosaico do tabaco, que, por ter sido o primeiro vírus cristalizado, foi também o primeiro a ser analisado por difração dos raios X.

O vírion do mosaico do tabaco tem a forma de um cilindro com 300 nm de comprimento por 18 nm de diâmetro. Nesse vírion, as extremidades do cilindro são abertas, embora haja víriоns helicoidais cujas extremidades são fechadas.

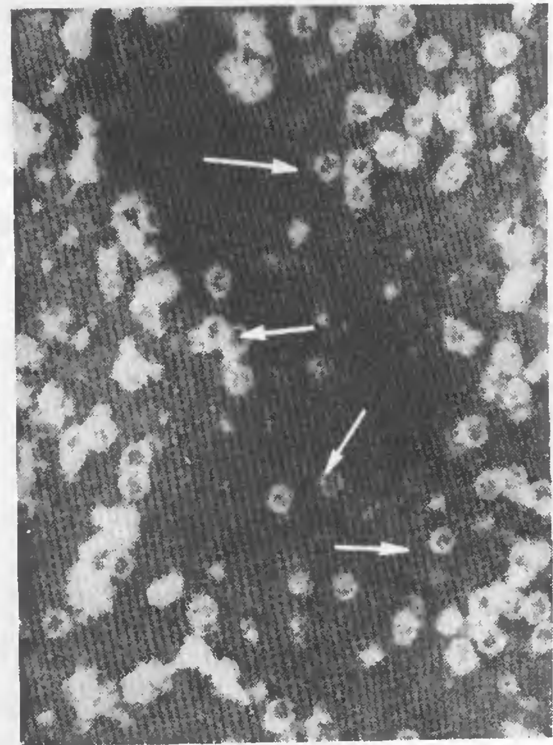


Fig. 16.3 Eletromicrografia do vírion da poliomielite. O espaço vazio, central, em cada vírion era ocupado pelo ácido nucléico (RNA), que foi removido. Coloração negativa com ácido fosfotúngstico. Aumento: 90.000 ×. (Cortesia do Dr. Dalton Ramalho Weigl.)

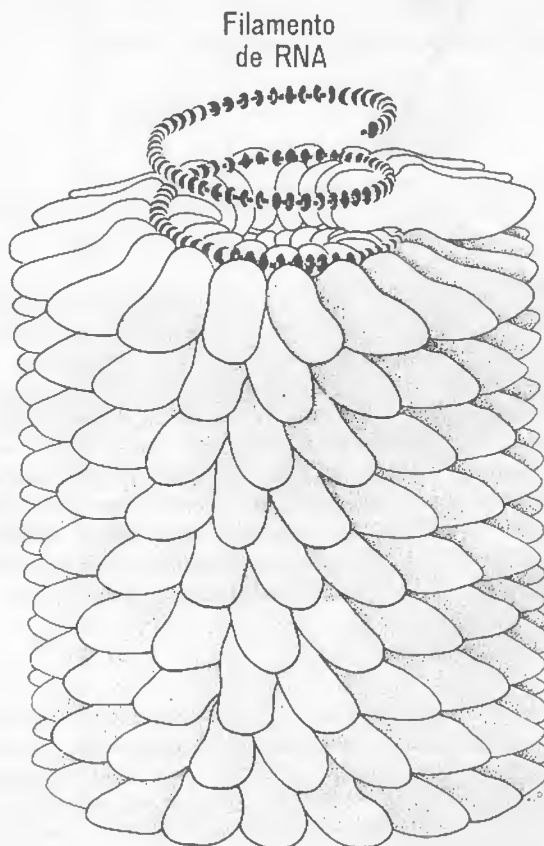


Fig. 16.2 Organização estrutural do vírion do mosaico do tabaco. Simetria helicoidal. Este vírion contém 2.130 subunidades protéicas organizadas como uma hélice, seguindo a hélice de RNA internamente localizada e que constitui o genoma.

O vírion do mosaico do tabaco contém 2.130 capsômeros organizados como uma hélice em torno de um orifício central de 4 nm de diâmetro. Cada capsômero é uma molécula protéica contendo 158 aminoácidos.

O RNA é um filamento único (Fig. 16.2), disposto em hélice ao longo do orifício central, unindo-se por ligações covalentes aos capsômeros. A molécula de RNA contém 6.400 nucleotídeos, e cada três nucleotídeos se combinam com um capsômero. Portanto, o comprimento desse vírion depende do tamanho da molécula de RNA.

A combinação do RNA com as moléculas protéicas, além de determinar o tamanho dos víriоns, aumenta muito a sua estabilidade. Chegou-se a essa conclusão através do estudo de agregação de capsômeros na ausência de RNA. Neste caso, formam-se partículas de forma semelhante à do vírion normal, porém de comprimento variável, e pouco estáveis.

Víriоns icosaédricos

Estes víriоns têm a forma de um icosaedro, que é uma figura geométrica com 20 faces triangulares e 12 vértices. Nos diferentes víriоns de simetria icosaédrica, variam o número e o tamanho dos capsômeros, porém todos têm 20 faces de forma triangular e 12 vértices.

O ácido nucléico dos víriоns icosaédricos situa-se no interior do capsídeo, e sua disposição parece ter certa relação com a for-

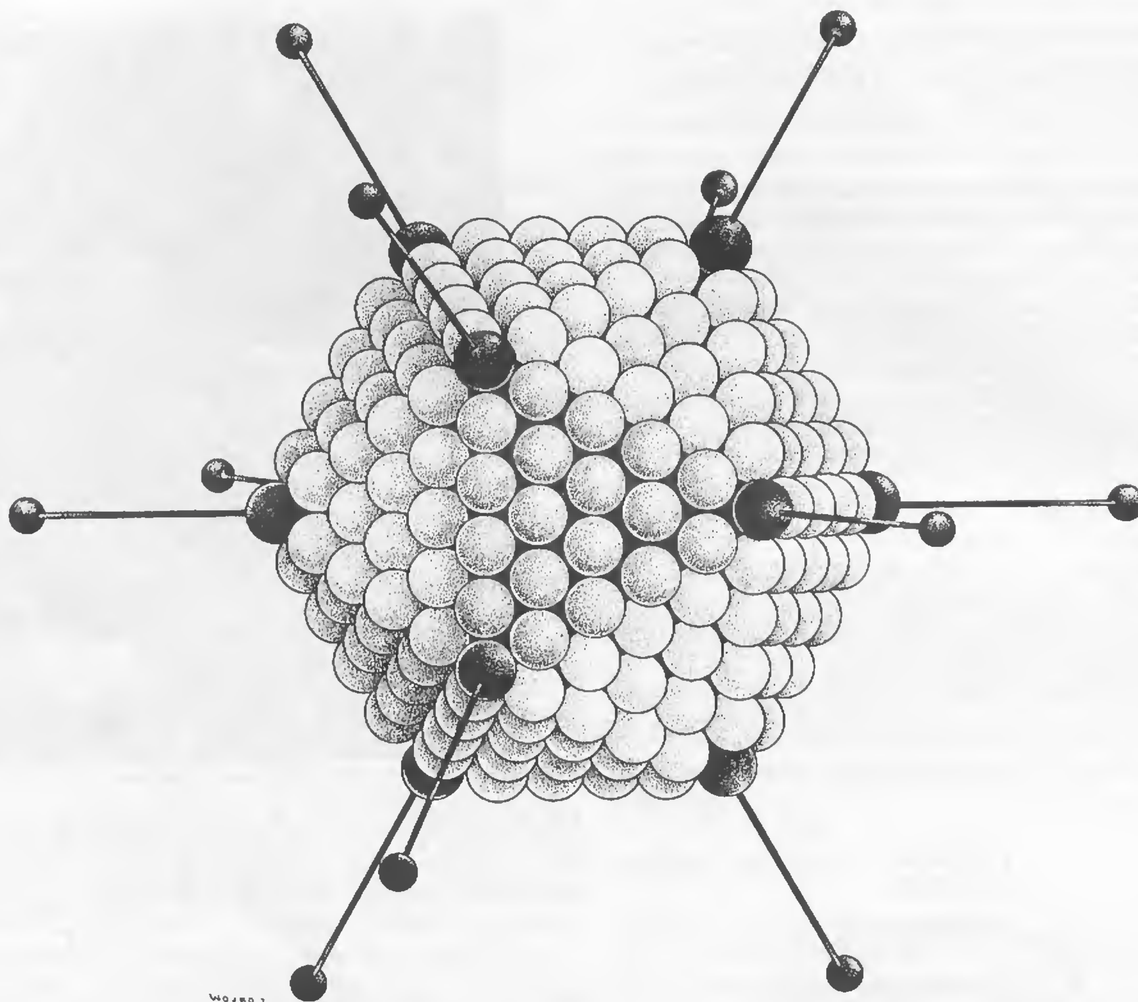


Fig. 16.4 O adenovírus tem simetria icosaédrica. Os capsômeros dos vértices, com seus filamentos, estão representados em negro.

ma do capsídeo, mas os detalhes deste relacionamento são desconhecidos.

O **adenovírus** é um exemplo de vírus cujas partículas têm simetria icosaédrica. Este vírus foi descoberto em material obtido de adenóides humanas, razão pela qual recebeu o nome de **adenovírus**. Seus vírions têm 89 nm de diâmetro e são formados por 252 capsômeros. Os 12 capsômeros dos vértices do vírion contêm filamentos que, provavelmente, facilitam a fixação dos vírions nas células sensíveis (Fig. 16.4).

Vírions com invólucro

Certos vírus são constituídos por nucleocapsídeos helicoidais ou icosaédricos, mas possuem um **invólucro** envolvendo e protegendo o nucleocapsídeo. Este invólucro é formado principalmente por moléculas (fosfolipídios) das membranas das células hospedeiras, às quais se adicionam proteínas codificadas pelo ácido nucléico virótico.

Entre os vírus cujos nucleocapsídeos são de simetria helicoidal, porém protegidos por invólucro, pode-se citar o importante grupo do mixovírus, no qual se inclui o vírus da gripe.

O vírion da gripe tem um nucleocapsídeo helicoidal muito semelhante ao do vírion do mosaico do tabaco, porém enovelado. Seu diâmetro é de 9 nm e cada subunidade protéica tem 3 nm. Em volta do nucleocapsídeo, encontra-se o invólucro lipoprotéico, com 6 a 10 nm de espessura. A superfície do invólucro possui filamentos radiais com 10 nm de comprimento por 1 nm de espessura.

Como exemplo de vírion icosaédrico com invólucro, será descrito o vírion causador do herpes. Seu nucleocapsídeo contém 162 capsômeros e é recoberto por um invólucro lipoprotéico com 4 a 10 nm. Como no caso do vírion da gripe, aqui também se encontram prolongamentos em direção radial que conferem ao vírion o aspecto de uma esfera com espinhos. Esse invólucro também se origina, principalmente, de componentes da célula hospedeira, porém contendo proteínas codificadas pelo genoma do vírus.

Vírions mais complexos

O grupo dos **poxvírus** inclui o agente causador da varíola humana e o vírus usado para vacinação contra varíola, chamado de **vírus da vacina**. Seus vírions têm morfologia complexa, e ainda não se sabe se eles exibem algum tipo de simetria. Por suas grandes dimensões, podendo atingir 0,3 μm, estes vírions são visíveis ao microscópio óptico.

Dentre os poxvírus, o vírion da vacina é o mais estudado, pois é de fácil cultivo e sua patogenicidade para o homem em geral se restringe a uma pústula no ponto de inoculação (vacinação antivariólica). Sua morfologia é exatamente igual à do vírion da varíola.

O vírion da vacina tem forma retangular; as bordas curvas medem 250 a 320 nm de comprimento. Esses vírions têm sido estudados ao microscópio eletrônico em cortes finos e em preparados com "coloração" negativa. Devido ao seu tamanho, é difícil estudá-los pela técnica de difração de raios X.

O vírion da vacina tem um **nucleóide central**, de forma bicôncava, que contém o DNA do vírus. Em cada lado do nucleóide, encontra-se uma estrutura ovóide denominada **corpo lateral**, cuja função é desconhecida. Envolvendo o nucleóide e os corpos laterais, existe um invólucro que, ao contrário do que ocorre com os outros invólucros viróticos, não é derivado da membrana da célula hospedeira.

Na superfície do vírion, sobre o invólucro, estão situados filamentos protéicos ocos que se entrelaçam, dando um aspecto granuloso ao vírion quando este é examinado ao microscópio eletrônico com "coloração" negativa.

A composição química da vacina também é mais complexa do que a dos demais vírions. Além de DNA e proteínas, ela contém 5% de lipídios, incluindo colesterol, fosfolipídios e gorduras neutras.

A Tabela 16.1 mostra a classificação dos vírus de acordo com a morfologia, genoma e algumas propriedades químicas.

Os viróides não apresentam capsômeros: são constituídos apenas por uma molécula de ácido nucléico

O primeiro viróide foi descoberto ao se procurar identificar e isolar o agente causador de uma moléstia de batata (doença do tubérculo afilado) e que se supunha ser um vírus. Observou-se que essa doença é causada por um agente constituído exclusiva-

Tabela 16.1 Principais grupos de vírus

GRUPO E ÁCIDO NUCLEICO	MORFOLOGIA	SIMETRIA DO CAPSÍDEO	TAMANHO DO VÍRION (nm)	PESO MOLECULAR DO ÁCIDO NUCLÉICO	NÚMERO DE GENES
Picornavírus RNA		I	20 a 30	2×10^{6}*	10
Arbovírus RNA		I	40 a 50	2×10^{6}	10
Reovírus RNA		I	70 a 75	10×10^{6}	50
Mixovírus RNA		H	80 a 200	2×10^{6}	10
Rabdovírus RNA		H	60 a 250	2×10^{6}	10

*Exceto o RNA de rinovírus, que possui peso molecular de 4×10^{6}

I= Icosaédrica H= Helicoidal

Tabela 16.1 Principais grupos de vírus (conclusão)

GRUPO E ÁCIDO NUCLÉICO	MORFOLOGIA	SIMETRIA DO CAPSÍDEO	TAMANHO DO VÍRION (nm)	PESO MOLECULAR DO ÁCIDO NUCLÉICO	NÚMERO DE GENES
Papovavírus DNA		H	40 a 55	2 a 5 × 10^6	10
Adenovírus DNA		I	60 a 85	23 × 10^6	50
Herpesvírus DNA		I	180 a 250 (pode ocorrer sem invólucro, medindo 110 nm)	estimado em 40 a 84 × 10^6	150
Poxvírus DNA		desconhecida	largura, 230 compr., 300	estimado em 160 a 240 × 10^6	400

I= Icosaédrica H= Helicoidal

mente de um ácido nucléico, medindo 50 nm, não associado a proteína e que não forma partículas virais completas. Esse tipo de agente patógeno foi denominado **viróide**, e logo se verificou que outras doenças vegetais também são causadas por viróides. É possível que certas doenças dos animais também sejam produzidas por viróides.

Os viróides até hoje descobertos são constituídos de RNA com peso molecular entre 75.000 e 100.000 dáltons. São, portanto, moléculas muito pequenas de RNA. Nos organismos parasitados, os viróides se localizam, de preferência — e talvez exclusivamente —, no interior dos núcleos celulares, em íntima associação com a cromatina.

O mecanismo de multiplicação dos viróides ainda é desconhecido, sendo difícil explicar, à luz dos conhecimentos atuais, como uma molécula tão pequena de RNA consegue induzir sua multiplicação nas células parasitadas. O RNA do viróide mais bem conhecido tem peso molecular suficiente para atuar como mensageiro na codificação de uma molécula protéica com apenas 70 a 80 aminoácidos. É portanto incapaz de codificar as unidades protéicas que constituem a RNA-polimerase (replicase).

Como os viróides se localizam nos núcleos celulares, é possível que eles se propaguem entre as células, protegidos por restos nucleares e fragmentos de cromatina.

O genoma viral pode ser repartido em vírions diferentes

Descobriu-se que, em certos vírus, as informações genéticas (genoma) não estão contidas em um só pedaço de ácido nucléico. O genoma desses vírus é constituído por mais de uma molécula de ácido nucléico. Essas moléculas, conforme o tipo de vírus, podem estar juntas no mesmo vírion ou em mais de uma partícula viral. Neste último caso, a infecção só tem lugar quando uma célula é invadida por mais de uma partícula viral.

Os vírus de genoma repartido até agora conhecidos são constituídos de RNA, e são freqüentes entre os vírus vegetais. Entre os vírus animais de genoma repartido estão os mixovírus, os reovírus e os oncornavírus, mas, em todos eles, cada partícula viral apresenta todo o conjunto de moléculas que constituem o genoma do vírus. Vírus com genoma repartido e em partículas virais separadas são conhecidos apenas entre os que causam doenças nas plantas (vírus vegetais).

Os vírus que parasitam as bactérias são denominados bacteriófagos (fago, *comer*)

As bactérias são atacadas por certos vírus chamados **bacteriófagos** ou **fagos**. Os bacteriófagos mais bem conhecidos são os que parasitam a bactéria *Escherichia coli*, principalmente os tipos T_2, T_4 e T_6, os quais em geral são descritos como exemplos de bacteriófago (Fig. 16.5). Contudo, há bacteriófagos muito diferentes, como mostra a Fig. 16.6, onde estão representados de modo esquemático os cinco tipos básicos de bacteriófagos.

Alguns bacteriófagos têm caudas com bainhas contráteis, enquanto outros têm caudas flexíveis, não-contráteis, e de tamanho variável. Há ainda os bacteriófagos sem cauda, que se assemelham aos vírus animais icosaédricos, e os bacteriófagos filamentosos (Fig. 16.6).

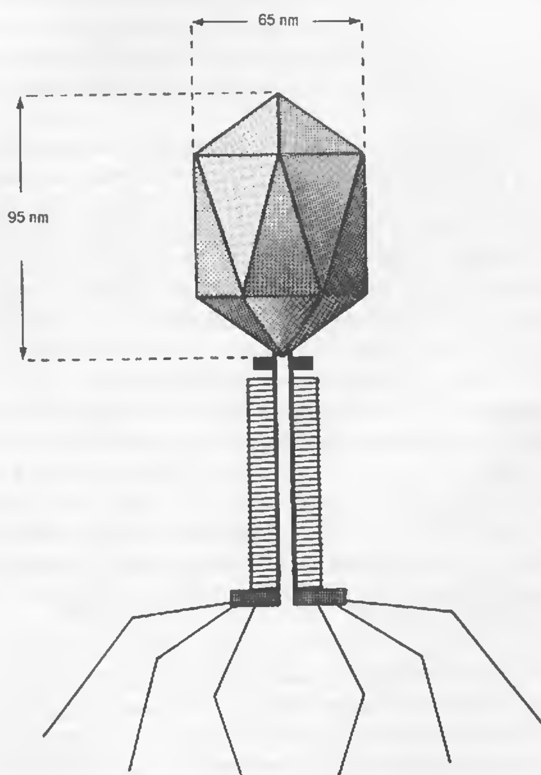


Fig. 16.5 Esquema de um bacteriófago T-par.

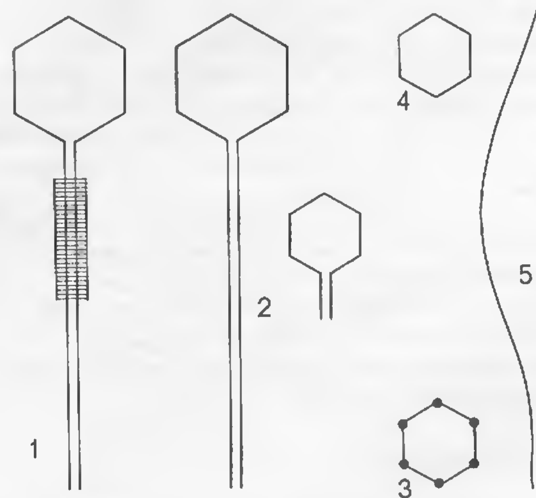


Fig. 16.6 Desenhos esquemáticos de diversos tipos morfológicos de bacteriófagos. 1. Bacteriófago tipo T-par, que possui cauda contrátil. 2. Bacteriófago com cauda longa (exemplo: T_5) ou curta (exemplo: T_3), não-contrátil. 3. Bacteriófago sem cauda e possuindo na cabeça algumas subunidades maiores. 4. Muito semelhante aos fagos do grupo 3, porém sem as subunidades maiores. 5. Bacteriófago filamentoso.

O estudo da proliferação dos bacteriófagos abriu caminho para o esclarecimento da multiplicação dos vírus animais e vegetais

O sistema constituído por um bacteriófago e sua bactéria hospedeira é extremamente favorável para o estudo da multiplicação dos vírus, primeiro porque as bactérias são de fácil cultivo e, segundo, porque é mais simples estudar a infecção de um organismo unicelular do que a de um animal ou planta. Por isso se conhece melhor a multiplicação do bacteriófago do que a de outros vírus.

Como exemplo será descrita a multiplicação do fago T_2 da *Escherichia coli*. Embora não se tenha ainda estudado a multiplicação de todos os bacteriófagos, não resta dúvida de que eles se multiplicam de modo basicamente similar à multiplicação do T_2.

O fago T_2 pode multiplicar-se por **multiplicação lítica** ou por **multiplicação lisogênica**.

Multiplicação lítica

Na multiplicação lítica, todas as bactérias infectadas são destruídas, isto é, lisadas pela atividade dos fagos. Daí o nome dado a este tipo de multiplicação.

Os bacteriófagos penetram nas células bacterianas e desviam completamente seu metabolismo, no sentido de produzir novos fagos. Em conseqüência, a síntese das macromoléculas da *Escherichia coli* fica paralisada, e esta acaba sendo lisada, libertando os novos bacteriófagos nela originados.

Na multiplicação lítica dos bacteriófagos, distinguem-se as fases de **adsorção**, **penetração**, **eclipse** e **liberação**.

Fase de adsorção

O processo de infecção da bactéria tem início pela fase de adsorção, durante a qual o fago desenrola as fibras da cauda e se fixa à parede da *E. coli*. Após o primeiro contato com a bactéria, entram em ação forças que fixam o fago na bactéria.

A adsorção parece ocorrer em duas etapas. A primeira é reversível na ausência de cátions e, provavelmente, deve-se à ação de forças eletrostáticas. Na segunda fase, irreversível, estabelecem-se ligações químicas firmes entre o fago e **receptores específicos** da parede bacteriana.

Conforme a bactéria, os receptores podem ser lipoproteínas ou lipopolissacarídeos. É necessário que exista uma complementaridade estereoquímica entre moléculas do fago e receptores da bactéria, e isso determina a especificidade entre o fago e a bactéria. Portanto, é limitado o número de bactérias que um fago pode infectar, como é também limitado o número de fagos aos quais uma certa bactéria é sensível.

Fase de penetração

Consiste na injeção do DNA do fago no interior da bactéria. A cabeça, a cauda e a bainha do bacteriófago T_2 não penetram, permanecendo presas à parede bacteriana.

A injeção do DNA se faz por atividade do próprio bacteriófago. Durante a fase de adsorção, ele se fixa fortemente à parede bacteriana por meio de fibras da cauda. Em seguida, a bainha se contrai e introduz a cauda do bacteriófago na espessura da parede bacteriana. Esta contração libera uma enzima que ataca a parede da bactéria sem destruir os receptores do fago. Então o bacteriófago injeta seu DNA no interior da bactéria.

Fase de eclipse

Após a penetração do DNA, segue-se uma fase em que não existem bacteriófagos com capacidade infectante nem visíveis ao microscópio eletrônico, pois o que há na *Escherichia coli* é o DNA do bacteriófago. Esta fase é denominada eclipse.

Retirando-se células bacterianas em diversos intervalos de tempo após a infecção com o bacteriófago, verifica-se que, só depois de 12 minutos, aparecem os primeiros fagos identificáveis com o microscópio eletrônico. Portanto, neste exemplo, a fase de eclipse dura 12 minutos.

Na fase de eclipse existe síntese de moléculas do DNA do bacteriófago, o que pode ser demonstrado pelo exame bioquímico de amostras retiradas do cultivo. Acontece que o DNA dos bacteriófagos T-pares contém certa porcentagem da base hidroximetilcitosina, que não existe no DNA da bactéria. Pela dosagem de hidroximetilcitosina, pode-se avaliar a síntese do DNA do fago, que começa 8 minutos após a fase de penetração.

Na fase de eclipse, os bacteriófagos consistem basicamente em seu DNA, não são infectantes por não possuírem o aparelho de inoculação e, naturalmente, não apresentam sua forma característica. Nesta fase, diz-se que os bacteriófagos estão sob a **forma vegetativa**.

Síntese das moléculas do fago

A síntese do DNA do fago pela bactéria começa cerca de 6 minutos após a infecção e avança rapidamente, tomando depois um ritmo menos acelerado. Como o fago destrói os cromosomas da bactéria, o DNA desta é hidrolisado e seus componentes aproveitados para a síntese de DNA do fago. Estima-se que um terço do DNA do fago é constituído de componentes dos cromosomas da bactéria.

Dentro dos primeiros 5 minutos após a infecção, aparecem as chamadas **proteínas precoces**. Essas proteínas são sintetizadas na bactéria sob a direção do DNA do bacteriófago, mas não serão incorporadas aos novos bacteriófagos. Entre as proteínas precoces estão enzimas que desligam a produção de macromoléculas bacterianas e que iniciam a síntese de DNA do fago.

As moléculas das **proteínas estruturais**, isto é, as que vão construir os vírions, começam a aparecer 10 minutos após a infecção, e seu número aumenta progressivamente.

A montagem dos bacteriófagos após a síntese do DNA e das proteínas ocorre espontaneamente, sem dispêndio de energia. No caso dos bacteriófagos T_2, a organização de novos fagos é devida à atividade de três linhas de montagem: uma forma as cabeças contendo o DNA envolvido pelos capsômeros; outra forma as caudas; e a terceira forma as fibras das caudas. Por fim, as três partes — cabeça, cauda e fibras da cauda — reúnem-se para constituir os bacteriófagos, como mostra a Fig. 16.7.

Como a montagem ocorre ao acaso, quando se infecta uma mesma bactéria com dois fagos diferentes aparecem vírions com o DNA e os capsômeros da cabeça de um dos fagos e a cauda com a proteína do outro fago. Este fenômeno, que produz fagos mistos, é chamado **mistura de fenótipos**. A mistura de fenótipos só tem lugar quando os fagos, apesar de diferentes, são aparentados, isto é, quando as diferenças entre eles não são grandes.

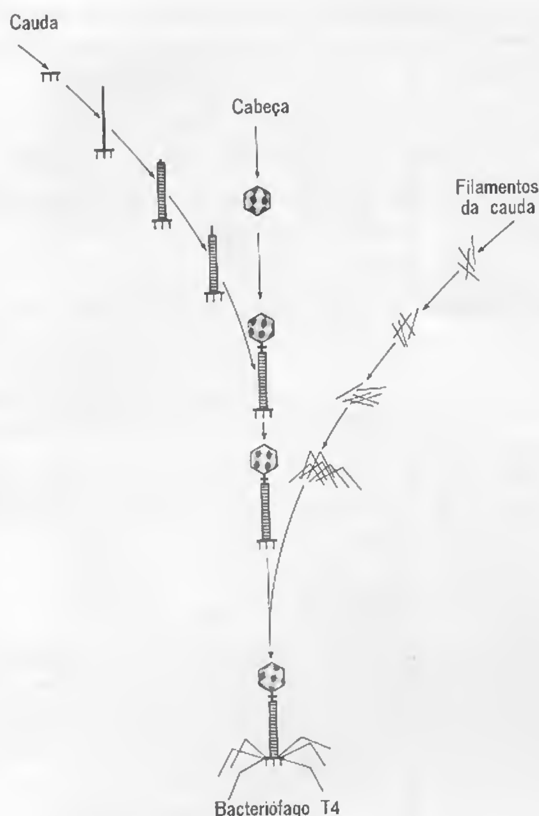


Fig. 16.7 Montagem dos bacteriófagos T-par.

Fase de liberação

Cerca de 12 minutos após a infecção, aparecem os primeiros vírions e seu número cresce até os 25 minutos. Nesse intervalo de tempo, cada bactéria sintetiza 50 a 100 novos fagos.

Enquanto seus componentes são sintetizados, os fagos vão sendo montados, e, quando seu número atinge certo valor, a célula bacteriana se rompe e os bacteriófagos são lançados no meio externo. Até que isto aconteça, todos os fagos estão no interior das bactérias. Por isso, todo o intervalo de tempo que vai da penetração do bacteriófago nas células até sua liberação para o meio de cultivo é chamado **período latente**. A parede bacteriana não permite a saída dos fagos, mas estes codificam a síntese de **lisozima**, enzima que ataca e destrói a parede da bactéria. Deste modo, os fagos saem das bactérias e passam para o meio ambiente.

Os bacteriófagos podem multiplicar-se junto com o genoma bacteriano sem destruir as bactérias (multiplicação lisogênica)

Os bacteriófagos podem multiplicar-se por um processo completamente diverso da multiplicação lítica e que não acarreta a destruição da célula hospedeira. Como foi explicado, na multiplicação lítica o cromossoma da bactéria é destruído e toda a maquinaria de síntese da bactéria é posta a trabalhar no sentido de produzir macromoléculas do fago.

Na multiplicação **lisogênica**, o DNA do fago liga-se ao cromossoma bacteriano e se multiplica juntamente com ele (Fig. 16.8). Esse tipo de multiplicação foi descoberto quando se verificou que certas cepas de *E. coli* são resistentes à lise pelos bacteriófagos, mas libertam, no meio onde são cultivadas, pequeno número de fagos típicos, capazes de multiplicação lítica em outras cepas de *Escherichia coli*.

Vírus animais, com genoma de RNA, também podem introduzir sua informação genética nos cromossomas. Isto se verifica pela ação de uma enzima denominada transcriptase reversa, que catalisa a síntese de DNA sobre um molde de RNA. Então o DNA formado, que é uma cópia do RNA do vírus, associa-se a um cromossoma. Esse processo relaciona-se com a transformação de células normais em células cancerosas.

Na multiplicação lisogênica, o DNA do fago une-se a certos locais do cromossoma da bactéria e multiplica-se junto com o cromossoma, passando para as bactérias-filhas. O bacteriófago que está sob essa forma é chamado **profago**. Chama-se **bacteriófago temperado** aquele que origina profagos. A bactéria que contém o profago é denominada **bactéria lisogênica** porque algumas delas, após sintetizarem vírions, como no ciclo lítico de replicação, sofrem lise e liberam bacteriófagos infectantes. Estas poucas bactérias, nas quais o bacteriófago passa da replicação lisogênica para a replicação lítica, são as responsáveis pelo aparecimento de alguns vírions no meio de cultura.

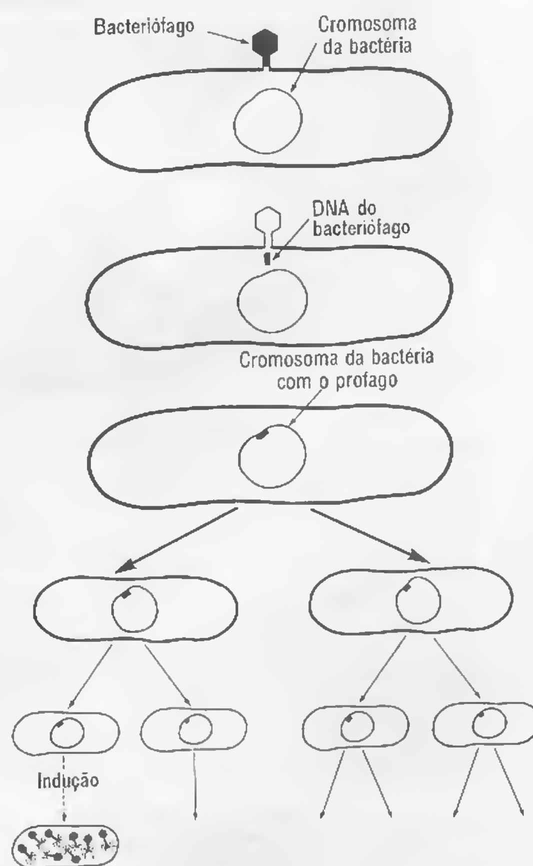


Fig. 16.8 Multiplicação lisogênica de um bacteriófago. O DNA do bacteriófago é sintetizado juntamente com o DNA da bactéria. As bactérias-filhas contêm o profago. Por indução, o profago torna-se virulento e causa a lise da bactéria (multiplicação lítica).

Mesmo em condições normais, alguns profagos tornam-se virulentos e entram em ciclo lítico. Certos agentes físicos ou químicos, que atuam sobre os ácidos nucléicos e são cancerígenos, como os raios X e a mostarda nitrogenada, induzem os profagos a se tornarem virulentos, causando assim a lise das bactérias portadoras do fago temperado. A transformação do profago em fago virulento chama-se **indução** (Fig. 16.8).

A multiplicação lisogênica do bacteriófago pode acarretar a transferência de DNA de uma bactéria para outra, tendo certamente influído na evolução das bactérias. Muitas vezes, ao se separar do cromosoma para entrar em ciclo lítico, o profago (DNA) leva preso um pedaço do cromosoma da bactéria. Este fago, ao se unir ao cromosoma de outra bactéria, introduz nesta a informação hereditária trazida da bactéria anterior. O profago é uma molécula de DNA que pode existir e se duplicar ora isoladamente, ora como parte de um cromosoma.

Muitas vezes, o próprio DNA do fago (profago), ligado ao cromosoma bacteriano, confere à bactéria um novo traço fenotípico. Esse fenômeno chama-se **conversão lisogênica**. Um profago pode influir na patogenicidade da bactéria. Um exemplo é a bactéria *Corynebacterium diphtheriae*, que produz toxina diftérica quando contém um profago. Portanto, a *Corynebacterium diphtheriae* contendo fago produz toxina e causa difteria, enquanto a não-infectada é incapaz de causar essa doença.

A multiplicação dos fagos com genoma de RNA é mais complexa porque as células não possuem enzimas para sintetizar RNA a partir de um modelo também de RNA (nas células, o RNA é copiado de um modelo de DNA). A multiplicação desses fagos requer uma RNA-polimerase nova no citoplasma da bactéria (Fig. 16.9).

Basicamente, os vírus animais se multiplicam da mesma maneira que os bacteriófagos

Nas condições naturais, esses vírus em geral penetram no corpo dos animais sensíveis através da mucosa das vias aéreas superiores e do tubo digestivo. Os vírions podem multiplicar-se nessas mucosas ou em outras células para as quais migram. Alguns vírus são transmitidos por picadas de insetos (arbovírus), penetrando através da pele.

Diversos vírus animais já tiveram seus processos de multiplicação analisados, como o da vacina, o da gripe e o adenovírus, que foram bem estudados.

Fase de adsorção

Os vírions que atacam as células animais não possuem estruturas especializadas para a fixação, como acontece com o bacteriófago T_2, mas sua superfície contém moléculas específicas para a adsorção que são complementares dos receptores existentes na superfície das células sensíveis.

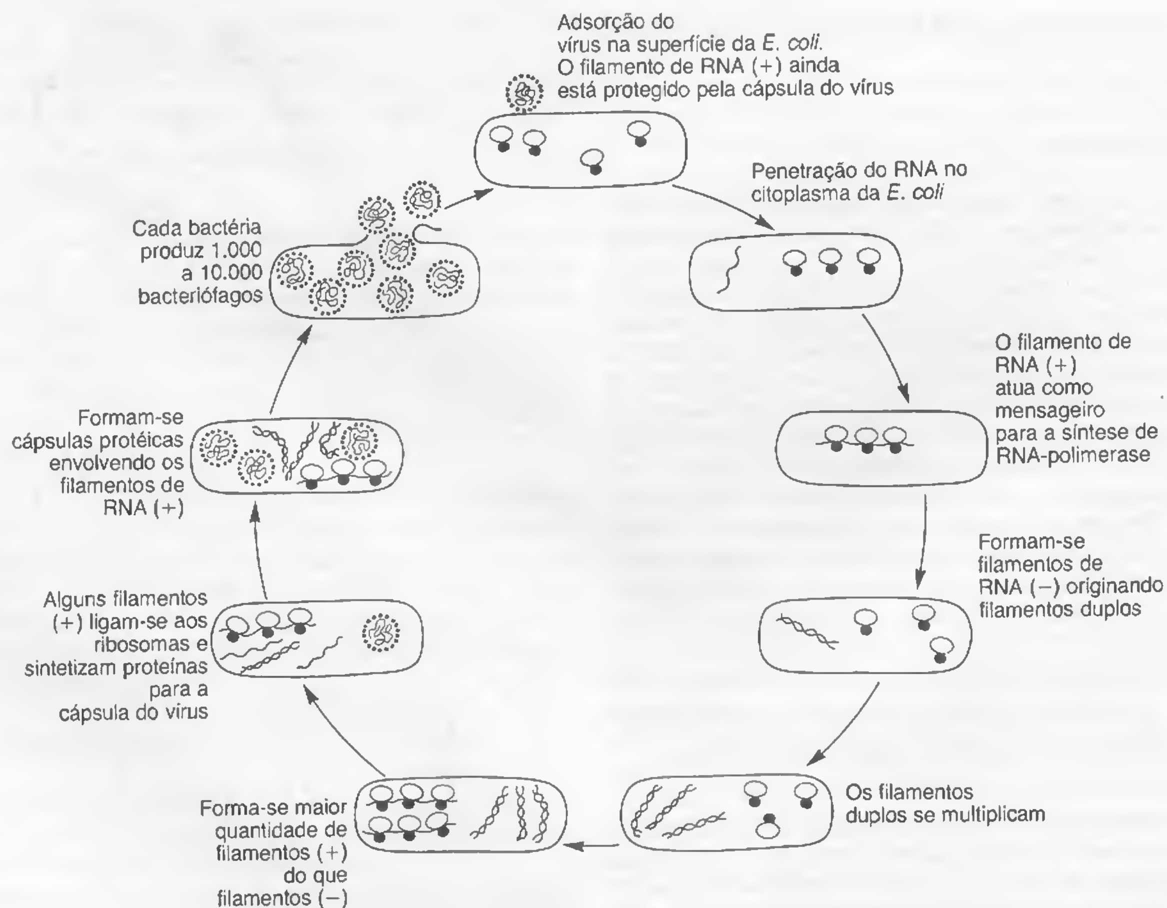


Fig. 16.9 Diversas fases da multiplicação de um bacteriófago cujo genoma é um filamento único de RNA.

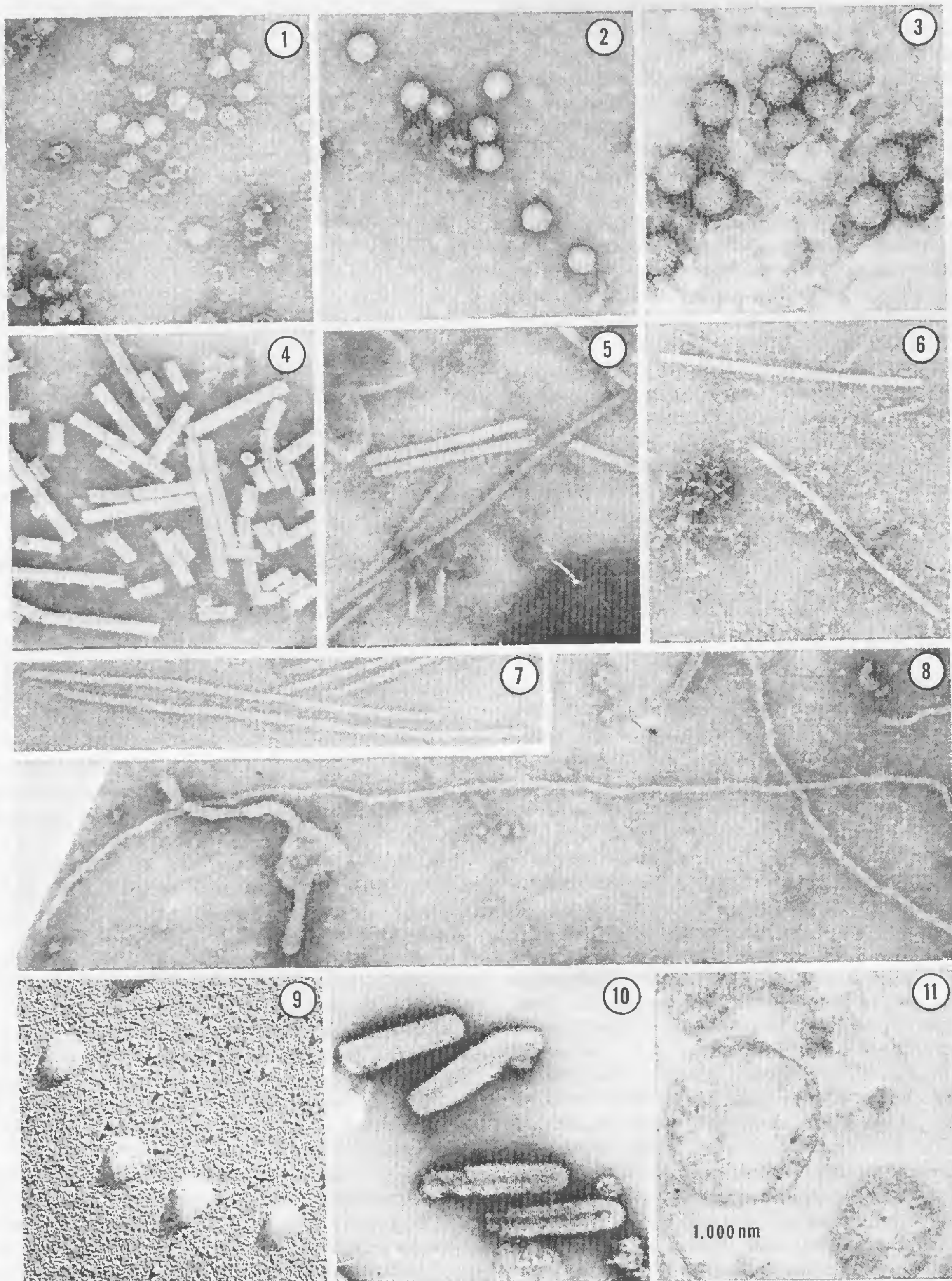


Fig. 16.10 Exemplo de vírus que causam doenças nos vegetais. 1. Mosaico da berinjela (30 nm). 2. Mosaico de *Mirabilis* (50 nm). 3. Nanismo da Pangola (70 nm). 4. Anel do pimentão (200 × 25 nm). 5. Mosaico do tabaco (300 × 20 nm). 6. Mosaico comum da mandioca (500 × 15 nm). 7. Mosaico-em-faixa da cebola (760 × 15 nm). 8. Tristeza do Citrus (2.000 × 10 nm). 9. Vira-cabeça (90 nm). 10. Faixa clorótica das nervuras do milho (300 × 70 nm). 11. Micoplasma do superbrotamento da mandioca (1.000 nm), incluído para comparação. 1 a 9, micrografias eletrônicas com coloração negativa. 10, micrografia eletrônica com sombreamento. 11, micrografia eletrônica de corte de tecido vegetal. (Cortesia do Dr. E. W. Kitajima.)

O estudo dessa fase foi facilitado pelo fato de o vírus da gripe ser adsorvido pela superfície das hemácias graças a um mecanismo semelhante à adsorção na célula hospedeira. Cada vírion contém diversos locais de adsorção, que vão unir-se aos numerosos receptores da superfície das hemácias. Misturando-se vírus gripais com hemácias, formam-se grandes agregados de hemácias e vírions, visíveis ao olho desarmado.

Portanto, a proteína dos locais de adsorção do vírion da gripe é uma **hemaglutinina**, sendo utilizada na prática para a identificação desses vírus.

Os receptores celulares para o vírus da gripe são glicoproteínas. Tratando-se hemácias ou células hospedeiras com a enzima **neuraminidase**, que ataca o ácido neuramínico existente em certas glicoproteínas, não ocorre adsorção dos vírions.

Os receptores são específicos para os diversos tipos de vírions e podem não ser glicoproteínas. Os receptores dos vírions da poliomielite, por exemplo, são constituídos por uma lipoproteína.

Fase de penetração

A penetração dos vírions nas células animais é mais fácil do que nas bactérias. As células animais não possuem paredes e são dotadas de mecanismos para o englobamento de partículas. Estes mecanismos são aproveitados pelos vírions para penetrarem nessas células.

Numerosos estudos de microscopia eletrônica mostraram que, após sua adsorção na superfície celular, os vírions são englobados no citoplasma pelo processo de pinocitose (v. Cap. 5). Uma vez no citoplasma, a vesícula de pinocitose funde-se com endosomas e lisosomas, cujas enzimas auxiliam a destruição do invólucro e do capsídeo do vírion, libertando o ácido nucléico. Todavia, o processo de liberação do ácido nucléico virótico não está ainda completamente esclarecido, e é possível que nele tomem parte outros fatores além das enzimas dos lisosomas.

Fase eclipse

Após a adsorção e a penetração, segue-se a fase de eclipse, durante a qual não existem vírions.

No início da fase de eclipse surgem as proteínas precoces, que inibem a síntese dos ácidos nucléicos e das proteínas da célula hospedeira. Entre as proteínas precoces estão também certas enzimas importantes para a síntese do ácido nucléico do vírion.

As moléculas que vão formar os vírions são sintetizadas no núcleo e no citoplasma da célula hospedeira.

Após a síntese dos diversos componentes viróticos, começa a montagem dos novos vírions. Esta montagem é um processo automático que ocorre independentemente da ação enzimática e não consome energia. As subunidades protéicas unem-se espontaneamente para constituir os capsídeos.

Como muitas vezes, espontaneamente, formam-se capsídeos helicoidais ou icosaédricos sem o ácido nucléico, fica patente que este não é essencial para a montagem dos vírions

Na montagem dos vírions animais, pode ocorrer também o fenômeno de mistura fenotípica, descrito na multiplicação do bacteriófago T_2.

O nucleocapsídeo de certos vírions é envolvido por fragmentos do envoltório nuclear ou da membrana plasmática no momento em que os vírions saem da célula hospedeira, formando-se, assim, os vírions com invólucros. Antes de ser incorporada ao vírion, a membrana recebe proteínas codificadas pelo ácido nucléico virótico.

Fase de liberação

Alguns vírions animais saem da célula hospedeira deixando-a intacta, enquanto outros causam a sua destruição, sendo liberados pela lise da célula.

O vírus da gripe, por exemplo, sai da célula por um processo muito parecido com o processo normal de extrusão dos grânulos de secreção.

O vírus do herpes deixa a célula hospedeira intacta, mas pode infectar células vizinhas sem passar pelo meio extracelular. Este vírus promove a fusão das membranas plasmáticas, formando-se células gigantes multinucleadas. Posteriormente, estas células reconstituem suas membranas e se separam, voltando à forma inicial. Isso explica por que o herpes é uma doença que se prolonga, com períodos de melhora e de recaída, apesar do elevado teor de anticorpos no sangue dos doentes. Passando diretamente de uma célula para outra, os vírions não entram em contato com os anticorpos presentes nos fluidos extracelulares.

Como as células normalmente sintetizam RNA sobre um modelo de DNA, os vírus com genoma de RNA dependem de processos especiais para sua replicação

Nas células, o RNA é sintetizado sobre um molde (*template*) de DNA, reação catalisada pela enzima RNA-polimerase normalmente existente no núcleo celular. As enzimas celulares, por conseguinte, não são adequadas à fabricação do ácido nucléico dos vírus cujo genoma é de RNA. Neste caso é preciso uma enzima nova, um tipo de RNA-polimerase que não existe nas células, e que seja capaz de copiar RNA em molde também de RNA. Este tipo especial de RNA-polimerase aparece nas células após a penetração do vírus com genoma de RNA.

Nos vírus cujo RNA é uma hélice dupla, após a penetração na célula, um dos filamentos da hélice liga-se imediatamente aos ribosomas e um segmento deste RNA atua como mensageiro para a síntese da nova enzima (nova RNA-polimerase).

Nos vírus com genoma constituído por filamentos simples de RNA, geralmente este filamento serve de mensageiro para a síntese da nova RNA-polimerase. Como o mensageiro é considerado o filamento positivo, o RNA destes vírus é tido também, por convenção, como RNA-positivo. Depois de catalisar a síntese da nova RNA-polimerase, o genoma viral é copiado em filamentos negativos que servirão como moldes para a formação dos filamentos positivos que serão incorporados aos novos vírus, constituindo os novos genomas (Fig. 16.9).

Entretanto, em outros casos, o filamento simples do genoma viral não atua como mensageiro, não sendo capaz de promover a síntese da nova RNA-polimerase. Nestes casos, diz-se que o RNA viral é negativo. Sua multiplicação só é possível porque os vírus com genoma de RNA negativo contêm pequena quantidade de RNA-polimerase especial, a eles incorporada no ciclo de multiplicação anterior. Portanto, quando estes vírus deixam a célula infectada, carregam a RNA-polimerase necessária para iniciar sua multiplicação quando eles penetrarem em células normais. Então, a RNA-polimerase trazida pelos próprios vírus catalisará a formação dos filamentos de RNA positivo, que vão codificar mais RNA-polimerase e catalisar também a formação de filamentos de RNA negativo para o genoma dos novos vírus.

Os vírus facilitam a fusão de células animais da mesma espécie ou de espécies diferentes

As primeiras observações sobre a capacidade dos vírus em promover o aparecimento de células multinucleadas foram feitas há muitos anos, embora na época não se suspeitasse do papel dos vírus na formação dessas células. Em 1873 foram encontradas células multinucleadas na periferia das lesões do vírus da vacina, isto é, nas pústulas da vacinação antivariólica. Em 1896, observação semelhante foi feita nas lesões da varicela, e, em 1931, foram vistas células multinucleadas nas tonsilas dos doentes de sarampo. Neste último caso, o fato foi imediatadamente relacionado com a infecção virótica, pois já se sabia que o sarampo é produzido por um vírus.

Quando se generalizou o emprego de culturas de células para cultivar vírus, essas observações foram ampliadas, chegando-se à conclusão de que numerosos tipos de vírus têm a propriedade de induzir as células a se fundirem, formando células binucleadas e células multinucleadas (sincícios). Descobriu-se que **células de animais de espécies diferentes**, cultivadas juntas e infectadas por certos vírus, também se fundem. Formam-se assim células com cromosomas de diferentes espécies, genericamente denominadas ***heterocários***.

Os heterocários têm sido utilizados para o estudo da fisiologia do núcleo celular e dos efeitos do citoplasma sobre o núcleo.

O vírus Sendai, do grupo dos mixovírus, é um dos mais usados para a obtenção de heterocários. Esse vírus induz rapidamente a formação de heterocários, e numerosas células animais são atacadas por eles, de modo que é possível a fusão de diversos tipos celulares. O vírus Sendai, que causa no homem uma doença parecida com a gripe, foi isolado pela primeira vez em Sendai, no Japão, daí recebendo o nome. Os vírus inativados pela radiação ultravioleta não perdem a propriedade de promover a fusão das células, sendo preferidos para obter heterocários, pois assim não há proliferação virótica, o que dificultaria a observação dos fenômenos celulares.

Na maioria dos heterocários multinucleados, apenas alguns núcleos entram em mitose ao mesmo tempo, enquanto os outros permanecem na intérfase. Em alguns heterocários, porém, todos os núcleos entram em mitose ao mesmo tempo. Nestes últimos casos, em geral não se forma o fuso mitótico, e a célula não se divide. Os núcleos que entram em mitose são reconstituídos como um núcleo único.

Nas células binucleadas, ao contrário, os núcleos geralmente entram em mitose de modo sincrônico; mas, como se forma um único fuso, o resultado são duas células-filhas, cada uma com um núcleo constituído por cromosomas de ambos os núcleos iniciais do heterocário. Desse modo, formam-se células mononucleadas mas que possuem cromosomas de espécies animais diferentes. Estas células podem multiplicar-se numerosas vezes, embora freqüentemente ocorra a eliminação de algum cromosoma em cada divisão, havendo tendência para permanecerem os cromosomas de uma espécie, enquanto os da outra vão sendo parcialmente eliminados.

A designação **sincário** tem sido usada para a célula que contém um único núcleo formado pela fusão de vários outros. Esta célula chama-se **homossincário** quando todos os núcleos fundidos são da mesma espécie animal; quando os núcleos são de espécies diferentes, chama-se **heterossincário**.

O heterocário formado pela fusão de células HeLa, que sintetizam DNA e RNA com eritrócitos de galinha — os quais não sintetizam DNA e quase não sintetizam RNA —, forneceu importantes resultados quanto aos efeitos do citoplasma sobre o núcleo. O estudo deste heterocário é facilitado pela lise que o vírus provoca no eritrócito de galinha. Destruindo a membrana do eritrócito, o vírus isola o núcleo dessa célula, que penetra no citoplasma da célula HeLa. A célula HeLa é uma linhagem celular obtida a partir de um carcinoma uterino humano. Uma vez que o citoplasma do heterocário deriva exclusivamente da HeLa, qualquer modificação no núcleo do eritrócito só pode ser promovida pelo citoplasma da célula HeLa. Observa-se que, após penetrar na HeLa, o núcleo do eritrócito, que é condensado, aumenta de volume e sua cromatina se torna frouxa, dando ao núcleo um aspecto claro. Ao mesmo tempo, este núcleo adquire a capacidade de sintetizar DNA e RNA. Nesse caso, a atividade sintética do núcleo e sua capacidade de multiplicar o material gênico são influenciadas pelo citoplasma em que o núcleo está colocado. Resultados idênticos foram obtidos com outros heterocários. Núcleos que não produzem mais DNA e RNA passam a fazê-lo após penetrarem no citoplasma de uma célula que sintetiza estas substâncias.

Os vírus causam diversas doenças no homem e nos animais

Os vírus causam diversas doenças no homem e nos animais, com maior ou menor gravidade, desde o resfriado comum e a gripe até doenças graves como a raiva, a AIDS (*acquired immuno deficiency syndrome*), a varíola e a poliomielite. A vacinação intensa e sistemática erradicou a varíola e reduziu consideravelmente os casos de poliomielite e raiva, mas ainda não existe vacina contra o vírus causador da AIDS, e esta doença representa sério problema médico e social.

Por outro lado, certos vírus estão implicados no aparecimento de alguns tipos de câncer. O câncer resulta da proliferação desordenada de uma célula, originando um clone que não se submete aos controles normais da expressão gênica. A célula cancerosa se multiplica com incrível freqüência, embora a duração de cada ciclo celular não esteja alterada. São células que escapam dos controles que moderam o número de mitoses, adaptando-o à sobrevivência do organismo. As células cancerosas dividem-se de modo continuado, formando geralmente massas celulares que constituem os tumores.

Quando os tumores se mantêm localizados, são **benignos**, mas os que se espalham formando a distância novos tumores, ou **metástases**, são **malignos** e difíceis de destruir por meios cirúrgicos ou químicos. Geralmente reserva-se a denominação de câncer para os tumores malignos. O câncer resulta de modificações no genoma de uma única célula, por mutações sucessivas que se somam até que a célula adquira as características de malignidade.

Muitos são os fatores que podem modificar o genoma de uma célula eucarionte, e um desses fatores é a introdução de DNA viral num cromosoma, ou até a simples presença do DNA do vírus dentro da célula, mesmo sem se ligar ao DNA cromosômico. Os vírus com genoma de DNA podem prender-se diretamente ao cromosoma. Esses vírus podem conter em seu genoma um segmento do DNA que funciona como oncogene (*onco*, câncer) ou então podem ativar um proto-oncogene do genoma celular, transformando-o num **oncogene**. Os **proto-oncogenes** são genes nor-

mais que influem na proliferação celular, sendo ativados em certas fases da vida celular e reprimidos em outras. A designação de proto-oncogenes, obviamente, não é a melhor para esses genes tão importantes para o desenvolvimento normal dos organismos. A ativação descontrolada de proto-oncogenes pelo vírus dá origem a oncogenes que causam ou, ao menos, contribuem para o aparecimento de tumores malignos.

Certos vírus com genoma de RNA, denominados retrovírus porque são capazes de transcrever a mensagem genética do RNA para o DNA, ao contrário do que acontece de modo geral, também têm sido implicados na formação de células malignas. Os retrovírus possuem oncogenes que são introduzidos nos cromosomas, depois que o RNA viral é transcrito para DNA pela enzima **transcriptase reversa**. Também nestes casos o oncogene levado pelo vírus ativa proto-oncogenes celulares, transformando-os em oncogenes.

Atualmente são conhecidos mais de 20 oncogenes, observados em vários tipos de tumores humanos malignos. A intenção deste breve resumo é apenas dar uma idéia da complexidade do problema. O leitor interessado deve procurar mais informações nos tratados da patologia geral, virologia e oncologia (*onco*, tumor, e *logia*, estudo). Além dos vírus, muitos outros fatores têm atividade carcinogênica (*carcino*, câncer, e *gênica*, geradora), incluindo-se elementos da própria célula, falhas no sistema de defesa do organismo (sistema imunitário) e a atuação de substâncias carcinogênicas, como as contidas no fumo de cigarro, por exemplo.

Doenças dos vegetais (pragas) causadas por vírus são muito comuns

Os vírus produzem grande número de doenças nos vegetais, causando graves prejuízos à agricultura. Dentre estas doenças podem ser mencionadas, como exemplos: o mosaico da berinjela, a tristeza do *Citrus*, a faixa clorótica das nervuras do milho e outras (Fig. 6.10).

Bibliografia

ALCANO, E. I. *Fundamentals of microbiology*. 2nd ed. The Benjamin Cummings Pub., 1986.
BISHOP, J. M. Viral oncogenes. *Cell*, *42*:23, 1985.
DULBECCO, R. and GINSBERG, H. S. *Virology*. 3rd ed. Lippincott, 1991.
FIELDS, B. N. and KNIPE, D. M. (eds.). *Fundamental Virology*. Raven, 1990.
GALLO, R. C. The first human retrovirus. *Sci. Am.*, *235* (Dec):88, 1986.
JAWETZ *et al. Medical Microbiology*. 19th ed. Appleton Lange, 1991.
LEVINE, A. *Viruses*. Sci. Am. Library, 1992.
NORTON, C. F. *Microbiology*. 2nd ed. Addison-Wesley Pub. Co., 1986.
PRIMROSE, S. B. and DIMMOCK, N. J. *Introduction to Modern Virology*. 2nd ed. Blackwell, 1980.

Glossário

Actina
Proteína muito abundante no citoplasma das células eucariontes e que existe sob a forma de monômeros globosos (actina G), ou sob a forma de filamentos constituídos pela polimerização da actina G. Os filamentos de actina fazem parte do citoesqueleto e participam dos movimentos de partículas e da célula como um todo.

ADP
Adenosina-difosfato; nucleotídeo originado pela hidrólise do grupo fosfato terminal da molécula de ATP no processo de liberação da energia armazenada no ATP; geralmente, é importado pelas mitocôndrias, onde é novamente fosforilado, para novamente armazenar energia sob a forma de ATP.

Aeróbias
Células que necessitam de oxigênio para utilizar as moléculas ricas em energia.

Amebóide
Tipo de movimentação celular pela emissão de prolongamentos citoplasmáticos curtos, os pseudópodos. Os glóbulos brancos do sangue e os macrófagos do tecido conjuntivo se locomovem por movimento amebóide.

Amido
O polissacarídeo utilizado pelos vegetais como reserva da energia; sua molécula, muito grande, é constituída exclusivamente por glicose.

Amplificação gênica
Aumento do número de cópias de certos genes durante a vida da célula.

Anabolismo
Parte do metabolismo que consiste na síntese de moléculas maiores, a partir de precursores menores.

Anaeróbias
Células que só conseguem viver na ausência do oxigênio; utilizam vias metabólicas que não necessitam de oxigênio, como a fermentação, para utilizar a energia contida nas moléculas dos nutrientes.

Anfipática
Molécula com uma região hidrofílica e outra hidrofóbica.

Anticódon
Os três nucleotídeos, na molécula do RNA de transferência, que reconhecem o códon do RNA mensageiro. A complementaridade entre o anticódon e o códon serve para inserir, na molécula protéica, o aminoácido transportado pelo RNA de transferência.

Anticorpo
Proteína sintetizada por células do sistema imunitário que interage com moléculas estranhas ou com a superfície de um microrganismo, sempre com grande seletividade. O anticorpo reage com a molécula, ou parte da molécula, que provocou sua formação.

Anticorpo monoclonal
Anticorpo produzido por um clone de células, isto é, por células que se originaram de uma única célula precursora. Esses anticorpos têm grande especificidade.

Apoenzima
Enzima sem o co-fator; é inativa.

Apoptose
Morte celular programada como parte de um processo normal. A célula recebe um sinal para se autodestruir, encolhe de tamanho, quebra a cromatina em pedaços e se torna facilmente fagocitada. A morte por apoptose não provoca inflamação.

ATP
Adenosina-trifosfato; nucleotídeo trifosfatado que é o principal depósito de energia para utilização rápida pela célula. O grupo fosfato terminal é facilmente removido, liberando muita energia, fosfato inorgânico e ADP (adenosina-difosfato). Este último composto recebe novo radical fosfato, armazenando energia novamente, principalmente por oxidação fosforilativa, nas mitocôndrias.

ATP-sintetase
Complexo enzimático encontrado na membrana interna das mitocôndrias, na membrana dos cloroplastos e na membrana plasmática das bactérias. Catalisa a síntese de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico.

ATPase
Enzima muito abundante nas células, que rompe a ligação química do grupo fostato terminal do ATP, liberando energia e gerando ADP e fosfato inorgânico.

Autocrinia
Estimulação da atividade de um tipo celular por moléculas produzidas por elas próprias.

Autofagia
Destruição de organelas e outros componentes celulares, que são envoltos pelo retículo endoplasmático liso e, em seguida, digeridos por enzimas da própria célula. Importante para a eliminação de componentes que a célula não mais necessita, assim como para a renovação de estruturas celulares.

Autólise
Destruição das células por suas próprias enzimas, geralmente após a morte do animal.

Autosomas
O conjunto dos cromosomas de uma célula, com exclusão dos cromosomas sexuais.

Autotrófico
Organismo que é capaz de sobreviver tendo o gás carbônico como única fonte de carbono para sintetizar moléculas complexas.

Auxina
Um tipo de hormônio que influencia as células vegetais.

Axonema
Feixe de microtúbulos e proteínas associadas, responsável pela movimentação dos cílios e flagelos das células eucariontes.

Axônio
Prolongamento da célula nervosa, geralmente longo, que conduz com grande velocidade o impulso nervoso; cada célula nervosa tem apenas um axônio.

Bacteriófago
Vírus que tem como hospedeiro as células procariontes (bactérias).

Blastômero
Célula indiferenciada que se forma pelas primeiras divisões mitóticas do óvulo fecundado.

Blástula
Fase precoce do desenvolvimento embrionário, quando o embrião consiste em uma massa de células com uma cavidade, a blastocele; a fase seguinte é a gástrula.

Bomba de íons
Proteína transmembrana que transporta íons, com gasto de ATP, para dentro ou para fora da célula; membranas das organelas tambem têm bombas de íons.

Caderina
Proteína da membrana plasmática, com função de aderência, que perde a capacidade de unir as células quando a concentração de íons cálcio é muito baixa no meio extracelular.

Calmodulina
Proteína citoplasmática das células eucariontes que sofre modificação na forma de sua molécula ao se ligar com íons Ca^{2+}, tornando-se capaz de se combinar com certas proteínas. Dessa maneira, na presença de Ca^{2+}, a calmodulina influi sobre a atividade de enzimas e de proteínas transportadoras.

CAMs
Cell adhesion molecules; são glicoproteínas integrais da membrana plasmática responsáveis pela adesão entre as células; algumas perdem a adesividade, quando a concentração de íons cálcio é muito baixa.

Canal iônico
Uma proteína transmembrana, possivelmente com um poro hidrófilo, que é permeável a um íon específico ou a alguns íons.

Capsídeo
Camada protéica que envolve o ácido nucléico dos vírus; tem forma geométrica e sua montagem é automática, sem gasto de energia.

Cápsula bacteriana
Camada viscosa, espessa, localizada externamente à parede de certas bactérias; pode dificultar a fagocitose da bactéria pelas células de defesa do organismo.

Carcinoma
Tumor maligno (câncer) originado de células epiteliais.

Cardiolipina
Fosfolipídio com quatro cadeias de ácidos graxos encontrado na membrana interna das mitocôndrias, mas não na membrana externa; a membrana plasmática das bactérias também contém cardiolipina.

Catabolismo
Ruptura enzimática de moléculas grandes, com a formação de moléculas menores e, geralmente, liberação de energia.

Catalisador
Molécula que influi na velocidade (geralmente acelerando) de uma reação química sem sofrer qualquer modificação; as células usam as enzimas, que são catalisadores biológicos.

cDNA
O mesmo que DNA complementar; molécula de DNA sintetizada como uma cópia de um RNA mensageiro, portanto, sem os íntrons.

Célula-alvo
A célula que tem receptores para determinada molécula ou sinal químico.

Célula HeLa
Linhagem celular derivada de carcinoma do útero, que se multiplica facilmente nas culturas (carcinoma é um câncer originado do tecido epitelial).

Células intersticiais do testículo
São células endócrinas, localizadas entre os túbulos seminíferos do testículo, que produzem o hormônio masculino testosterona.

Centrifugação fracionada
Técnica para separar organelas celulares em grande quantidade, baseada no fato de que, desde que sejam mais densas do que o meio onde estão suspensas, as organelas centrifugadas tendem para a parte distal do tubo onde estão contidas, numa velocidade que depende da forma e do tamanho de cada organela. São feitas centrifugações sucessivas, a forças (velocidades de centrifugação) cada vez maiores, separando-se assim, em cada centrifugação, um tipo de organela.

Centríolo
Pequeno cilindro constituído de microtúbulos e proteínas associadas (muito semelhante ao corpúsculo basal); em geral, cada célula tem um par de centríolos, localizados no centrosoma.

Centro ativo
Região na superfície da molécula enzimática, onde se prende o substrato da enzima.

Centrômero
Ou constrição primária, é a porção estreitada dos cromosomas, que contém os cinetocoros, onde se prendem os microtúbulos do fuso mitótico. Na duplicação dos cromosomas, o novo cromosoma formado (cromátide) permanece ligado, durante certo tempo, ao cromosoma antigo pelo centrômero.

Centrosoma
Ou centro celular; é o principal centro de organização dos microtúbulos; na mitose, forma os centros organizadores do fuso. Localiza-se próximo ao centro da célula e, na maioria das células animais, contém um par de centríolos.

Cianobactéria
Ou cianofícea, é um procarionte complexo que contém membranas e vesículas fotossintéticas.

Ciclo do ácido cítrico
Também chamado ciclo de Krebs ou ciclo do ácido tricarboxílico, é uma via metabólica que tem lugar nas mitocôndrias e que oxida metabólitos (grupos acetil) provenientes dos nutrientes, retirando energia e produzindo, no final, água e gás carbônico.

Cílio
Extensão filamentosa e móvel da superfície de certas células; contém microfilamentos de actina; movimenta algumas células; nos epitélios, movimenta material estranho, fazendo parte dos mecanismos de defesa.

Cinesina
Proteína motora, de peso molecular elevado, que movimenta vesículas e organelas ao longo dos microtúbulos.

Cinetocoros
Discos localizados nos centrômeros, onde se inserem os microtúbulos do fuso mitótico.

Cisterna
Compartimento intracelular, delimitado por membranas do retículo endoplasmático ou do aparelho de Golgi.

Citocinese
Na mitose, divisão do citoplasma que se segue à divisão do núcleo; tem início na anáfase e termina após a telófase. Produzida pela contração de um anel citoplasmático que contém actina e miosina.

Citocromos
Transportadores de elétrons, constituídos por proteínas contendo o grupamento heme, que contém ferro.

Citoesqueleto
Um arcabouço intracelular, constituído por três tipos de filamentos: microfilamentos de actina, filamentos intermediários e microtúbulos. Fornece apoio para o posicionamento das organelas, representa parte da maquinaria que possibilita os movimentos das células e das estruturas intracelulares, estabelece uma conexão funcional entre o meio intracelular e o extracelular, através de proteínas transmembrana, e exerce outras funções.

Citosol
O mesmo que matriz citoplasmática; inclui todos os componentes do citoplasma que preenchem o espaço entre as organelas.

Clamídias
Grupo de bactérias que só podem viver e se multiplicar no interior de células eucariontes; são células incompletas.

Clatrina
Uma proteína encontrada nas vesículas encobertas (*coated vesicles*) que se formam na pinocitose.

Clonagem gênica
A produção de numerosas cópias de um gene, através de muitos ciclos de replicação.

Clone celular
População de células derivadas de sucessivas divisões de uma única célula.

Cloroplasto
Organela encontrada nas células vegetais e nas algas verdes, constituída por membrana dupla; internamente, o cloroplasto tem um sistema delimitado por membrana, contendo clorofila, pigmento que capta a energia da luz para a fotossíntese; cada cloroplasto possui várias moléculas circulares de DNA.

Códon
Seqüência de três nucleotídeos, na molécula do RNA mensageiro, que representa a instrução para a incorporação de um determinado aminoácido no polipeptídeo em formação.

Códon de iniciação
É o códon AUG, onde o ribosoma se prende ao RNA mensageiro, assegurando a leitura correta do mRNA e a síntese do polipeptídeo com a seqüência correta de aminoácidos.

Códon de terminação
Seqüência de três nucleotídeos, na molécula do RNA mensageiro, que significa a instrução para término da síntese do polipeptídeo. Há mais de um códon de terminação.

Coenzima
Molécula que é necessária para atividade da enzima (a coenzima é um tipo de co-fator). Em geral termoestáveis (as enzimas são termolábeis).

Co-fator
Molécula ou íon que é necessário para a atividade de certas enzimas.

Colágeno
Uma família de glicoproteínas fibrosas, muito resistentes a trações e que geralmente formam fibras no meio extracelular.

Complexo sinaptonêmico
Abreviadamente, CS; estrutura responsável pelas sinapses cromossomais, na fase de zigóteno da prófase I da meiose, quando ocorre recombinação genética. Essas sinapses unem cromossomas homólogos para formar tétrades (cromossomas com quatro cromátides). Não confundir com sinapse entre células nervosas.

Corpo residual
Lisosoma com resto de material que resistiu à digestão pelas enzimas do lisosoma.

Corpúsculo basal
Pequeno cilindro constituído por microtúbulos e proteínas associadas, existente na base dos cílios e flagelos das células eucariontes.

Cristas mitocondriais
Dobras, em forma de prateleiras ou de túbulos, que aumentam a superfície da membrana interna das mitocôndrias.

Cromátide
Uma cópia do cromosoma que ainda se acha presa, pelo centrômero, à outra cópia; os filamentos de DNA recebem essa designação nos cromosomas das células em divisão.

Cromatina
Material intranuclear, constituído por DNA e proteínas, que se cora pelos corantes básicos; corresponde aos cromosomas da célula que não está em divisão.

Cromatina sexual
Está presente nas células dos mamíferos do sexo feminino; consiste na cromatina de um cromosoma X que permanece condensado. Geralmente localizada na profundidade do núcleo ou presa ao envoltório nuclear.

Cromosoma
Estrutura constituída por DNA e proteínas; muito comprido nas células que não estão em divisão; a molécula de DNA permanece íntegra durante toda a vida da célula, porém os cromosomas são mais facilmente visíveis durante a mitose e a meiose, quando estão condensados; contém quase toda a informação genética da célula.

Cromosomas sexuais
Os cromosomas que determinam o sexo (XX ou XY, na espécie humana).

Crossing over
O mesmo que recombinação genética; é o rearranjo de genes que mudam de posição durante a meiose, como resultado da ruptura e reunião de segmentos dos cromosomas homólogos (um materno e o outro paterno).

Dálton
Medida da massa molecular; 1 dálton é igual à massa de um átomo de hidrogênio.

Desidrogenase
Enzima que remove átomos de hidrogênio de uma molécula, transferindo-os para outra molécula.

Desmosoma
Especialização da superfície de duas células contíguas, com a função de aderência. Tem forma de disco, e, na membrana de cada célula, existe uma placa onde se inserem filamentos intermediários de queratina. São freqüentes entre as células epiteliais.

Diferenciação
O processo que leva uma célula a se especializar numa determinada função (contração, secreção), que ela passa a executar com grande eficiência.

Dineína
Uma molécula protéica muito grande, com peso molecular acima de 1 milhão de dáltons, que funciona como um motor intracelular para a movimentação de organelas, vesículas secretórias, cromosomas mitóticos e outras estruturas.

Diplóide
Célula que contém os dois conjuntos de cromosomas homólogos (um paterno e um materno); portanto, contém uma duplicata de cada gene.

DNA-polimerases
Enzimas que participam da síntese de novos filamentos de DNA, copiando os filamentos antigos.

DNA recombinante
Moléculas de DNA contendo seqüências nucleotídicas provenientes de mais de uma fonte.

DNA satélite
DNA altamente repetitivo (muitos nucleotídeos iguais) que se concentra na heterocromatina constitutiva (não confundir com satélite do cromosoma).

Elétron-densa
Estrutura que dispersa os elétrons, aparecendo escura nas micrografias eletrônicas.

Emulsão fotográfica
Suspensão de cristais de brometo de prata em gelatina, sensível à luz e às radiações; não se trata de uma emulsão verdadeira, no sentido físico.

Endocitose
Penetração de moléculas na célula, através de modificações da membrana plasmática, visíveis no microscópio eletrônico. Trata-se de um processo onde as moléculas penetram em quantidade, envoltas por membrana.

Endonuclease de restrição
Também conhecida simplesmente como enzima de restrição: enzima que corta a molécula de DNA em locais específicos, identificados por uma seqüência de nucleotídeos, que é reconhecida pela enzima.

Endossimbiose
É o processo de simbiose intracelular; admite-se que os cloroplastos e as mitocôndrias se originaram, durante a evolução das células, por endossimbiose de células procariontes, que, aos poucos, passaram parte dos seus genomas para a célula hospedeira.

Endotoxina
Substância tóxica que é parte integrante da parede das bactérias Gram-negativas, geralmente liberada quando a bactéria morre.

Enzima de restrição
Outra designação para uma endonuclease de restrição: enzima que corta a molécula de DNA em locais específicos, identificados por uma seqüência de nucleotídeos, que é reconhecida pela enzima.

Esferoplasto
Uma célula bacteriana Gram-negativa cuja parede foi removida incompletamente. A bactéria perde sua forma característica e se torna esférica.

Estrutura primária
A seqüência dos aminoácidos que constituem a molécula de um polipeptídeo.

Estrutura quaternária
Organização espacial de uma molécula protéica constituída por mais de um polipeptídeo. Em geral, mantida por forças fracas, como pontes de hidrogênio. Exemplos: microtúbulos, filamentos de actina, capsômeros dos vírus.

Estrutura secundária
A organização tridimensional de **partes** da molécula de um polipeptídeo; o arranjo tridimensional do polipeptídeo inteiro é sua estrutura terciária.

Estrutura terciária
A forma tridimensional de um polipeptídeo inteiro, que pode existir isolado ou, unindo-se a outros polipeptídeos, formar a estrutura quaternária da molécula protéica.

Eucromatina
Cromatina frouxa, correspondente à parte não condensada dos cromosomas (transcreve a informação genética).

Exocitose
O processo de fusão da membrana de uma vesícula intracelular com a membrana plasmática, levando à saída das moléculas contidas na vesícula, para o meio extracelular.

Éxons
As partes da molécula de um pré-RNA mensageiro (ou seu equivalente no DNA) que vão codificar uma cadeia polipeptídica após remoção dos íntrons.

Exotoxina
Substância tóxica sintetizada e secretada por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Extremidade +
Das duas pontas do microtúbulo, ou do microfilamento de actina, aquela que recebe subunidades com maior velocidade; o microtúbulo, ou o microfilamento, cresce pela extremidade + (mais).

FACS
Fluorescence-activated cell sorter; aparelho que separa células em suspensão, desde que algumas delas estejam marcadas com um composto fluorescente; as células fluorescentes são separadas das não-fluorescentes, em recipientes distintos.

Fagocitose
Processo onde a célula forma prolongamentos (pseudópodos) que englobam partículas e as introduzem no citoplasma.

Fase G1
(*Gap* 1) fase do ciclo celular, de duração muito variável, situada entre a mitose e a fase S.

Fase G2
(*Gap* 2) fase do ciclo celular preparatória para o início da mitose, situada entre a fase S e a mitose.

Fase S
Fase do ciclo celular durante a qual tem lugar a síntese de DNA.

Fenótipo
As características observáveis de uma célula ou organismo (em grande parte, depende do genótipo).

Fibronectina
Glicoproteína com a função de fixar as células à matriz extracelular; sua molécula adere, por um lado, a proteínas da matriz e, por outro, a proteínas da membrana plasmática.

Fibronexo
O conjunto de macromoléculas que estabelece uma comunicação funcional entre o citoesqueleto e a matriz extracelular; compreende moléculas da membrana plasmática, do citoplasma e do meio extracelular.

Filamentos intermediários
Filamentos do citoesqueleto com aproximadamente 10 nm de diâmetro, constituídos de proteínas diferentes, conforme o tipo celular; são resistentes e oferecem estabilidade à forma da célula, além de participarem de outras funções.

Fímbrias
Prolongamentos não-móveis, finos, das células bacterianas; participam da transferência de DNA de uma bactéria para outra.

Fixação de nitrogênio
O processo pelo qual o gás nitrogênio é quimicamente reduzido e utilizado para a síntese de compostos nitrogenados de carbono.

Flagelo
Prolongamento longo e contendo microtúbulos, responsáveis pela movimentação de células eucariontes de vida livre; nos mamíferos, está presente exclusivamente nos espermatozóides; usa energia acumulada em ATP.

Flagelo da bactéria
É completamente diferente do flagelo das células eucariontes; nas bactérias, os flagelos são polímeros da proteína flagelina; o movimento rotatório do flagelo da bactéria é impulsionado por energia fornecida por um fluxo de prótons.

Fosforilação
Ligação covalente de um grupamento fosfato a uma molécula.

Fotorrespiração
Consiste na oxidação de compostos resultantes da fotossíntese, formando hidratos de carbono como produto final. Na fotorrespiração, há consumo de oxigênio e produção de gás carbônico.

Fusão celular
União de duas ou mais células que, ao entrarem em contato, rompem suas membranas plasmáticas e misturam seus conteúdos, formando uma célula única.

Gene regulador
Gene que codifica uma proteína repressora da atividade de outros genes.

Genoma
A totalidade da informação genética contida na célula e que é característica e exclusiva para cada ser vivo.

Genótipo
A constituição genética total de uma célula ou de um organismo.

Glicocálice
Uma camada intimamente ligada ao folheto externo da membrana plasmática e formada pelas porções glicídicas de moléculas da própria membrana (glicoproteínas, glicolipídios), mais moléculas que são secretadas para o meio extracelular e aderem à superfície das células. Sua composição molecular varia de uma célula para outra.

Glicogênio
É o polissacarídeo usado como reserva energética pelas células animais; constituído pela polimerização de moléculas de glicose; ao microscópio eletrônico, aparece como pequenos grânulos.

Glicosaminoglicana
Também chamada abreviadamente de GAG; polissacarídeo de molécula muito grande e que consiste em unidades repetidas, cada unidade formada por dois glicídeos, sendo um deles aminado. Geralmente ligada a uma proteína para constituir uma proteoglicana. É um componente da matriz extracelular.

Glioxisomas
São peroxisomas especiais, encontrados em certos protistas (Euglena, por exemplo) que contêm as enzimas do ciclo do ácido glioxílico.

Haplóide
Célula que contém apenas um conjunto de cromosomas, como os óvulos e espermatozóides.

Helicase
Enzima que separa as duas cadeias do filamento duplo de DNA, consumindo energia do ATP para romper as pontes de hidrogênio entre as bases. Essencial para a replicação do DNA e para a síntese de RNA na transcrição.

Hemidesmosoma
Estrutura especializada na função de aderência, encontrada na porção basal da membrana plasmática de células epiteliais, em contato com a lâmina basal. Tem forma de disco e é semelhante ao desmosoma, porém faltando a parte correspondente à célula vizinha. Ao hemidesmosoma, como ao desmosoma, se prendem filamentos intermediários de queratina.

Hemocitopoese
Ou hemopoese é a formação de células para substituir os glóbulos sangüíneos, cuja vida é muito curta; tem lugar principalmente na medula óssea vermelha e também no timo, baço, linfonodos e nódulos linfáticos.

Hemólise
Ruptura da membrana plasmática das hemácias, que acontece quando elas são colocadas em meio hipotônico. Inicialmente, a hemácia aumenta de volume e depois se rompe, liberando seu conteúdo.

Heterocário
Célula com dois ou mais núcleos, formada pela fusão de células diferentes.

Heterocromatina
Cromatina que permanece condensada e, portanto, geneticamente inativa.

Heterocromatina constitutiva
É a heterocromatina que permanece condensada em todas as células de um determinado organismo; é constituída por seqüências curtas e repetitivas de DNA.

Heterocromatina facultativa
É a heterocromatina que se apresenta condensada em algumas células, mas não em outras, do mesmo organismo. Não é formada por seqüências repetitivas de DNA. Exemplo: a cromatina sexual que, numas células, é formada pelo cromosoma X paterno e, em outras, pelo cromosoma X materno.

Heteropolímero
Molécula polimérica, constituída de monômeros diferentes (exemplo: ácidos nucléicos, formados pela união de nucleotídeos).

Heterotróficas
Células que dependem de um suprimento externo de compostos de carbono; são incapazes de sintetizar moléculas complexas de carbono a partir de moléculas muito simples, como o gás carbônico.

Hibridização *in situ*
Técnica para a localização do DNA. O DNA é conservado no seu local, e sobre ele se faz reagir moléculas conhecidas e marcadas de DNA ou de RNA. A identificação da molécula marcada indica a localização do DNA procurado.

Hibridoma
Linhagem celular mista, formada pela fusão de plasmócitos (células produtoras de anticorpos) com células de mieloma (malignas). As células do hibridoma se multiplicam e produzem grande quantidade de um só tipo de anticorpo, por isso chamado anticorpo monoclonal.

Hipertônico
Qualquer meio, ou solução, com alta concentração de solutos; causa a saída de água da célula, com diminuição do volume celular.

Hipotônico
Qualquer meio, ou solução, com tão baixa concentração de solutos, que causa a entrada de água nas células; no meio hipotônico, a célula aumenta de volume e pode rebentar.

Holoenzima
Complexo da enzima com o co-fator.

Homopolímero
Molécula polimérica constituída de monômeros semelhantes (exemplo: as proteínas que contêm apenas aminoácidos).

Inibição por contato
É a parada nas mitoses de células cultivadas sobre um substrato, quando o crescimento de um grupo de células se encontra com o crescimento proveniente de outro grupo celular; não existe inibição por contato na proliferação de células cancerosas.

Inibidor competitivo
Inibidor que se liga ao sítio ativo da enzima e compete com o substrato pela ocupação desse sítio; a atividade do inibidor é diminuída quando se aumenta a concentração do substrato.

Inibidor não-competitivo
Inibidor de uma enzima que não se liga ao sítio ativo da enzima, e, por isso, a inibição depende somente da concentração do inibidor, sendo independente da concentração do substrato da enzima.

Integrina
Proteína transmembrana que participa da ligação do citoesqueleto com a matriz extracelular.

Intercinese
Estágio entre a primeira e a segunda divisão meiótica. Na intercinese, o número de cromossomas é haplóide, mas a quantidade de DNA é diplóide, pois cada cromossoma é duplo (tem duas cromátides).

Intérfase
Período da vida da célula entre duas divisões mitóticas.

Intermediário metabólico
Molécula produzida por uma etapa de uma via metabólica.

Íntrons
As partes da molécula de um pré-RNA mensageiro, ou seu equivalente no DNA, que são removidas por "*splicing*", para possibilitar a junção dos éxons que irão constituir a molécula do RNA mensageiro.

Isoenzimas
Moléculas enzimáticas, ligeiramente diferentes, que atuam sobre o mesmo substrato e catalisam a mesma reação; a principal diferença entre elas está na intensidade da atividade enzimática.

Junção aderente
Muito freqüentemente, forma **zônula aderente**, isto é, envolve toda a periferia da célula, como um cinto. Apresenta uma placa na face citoplasmática da membrana, onde se prendem filamentos de actina. Tem a função de prender as células, sendo muito comuns nos tecidos epiteliais.

Junção comunicante
Ponte citoplasmática que comunica o conteúdo de células vizinhas, fazendo com que elas funcionem em conjunto.

Lâmina basal
Material extracelular que envolve as células musculares e adiposas, e separa os epitélios do tecido subjacente; constituída por colágeno tipo IV e diversas outras proteínas.

Lâmina nuclear
Camada localizada na face interna do envoltório nuclear, constituída por filamentos formados por três proteínas denominadas laminas* A, B e C. Cada molécula de lamina é um dímero (dois polipeptídeos).

Laminina
Glicoproteína constituída por três polipeptídeos enovelados e formando uma cruz, que se liga a proteínas da membrana plasmática e, também, a proteínas da matriz extracelular. Tem a função de prender as células à matriz.

Lectina
Moléculas com, no mínimo, dois sítios ativos que se ligam a hidratos de carbono e podem aglutinar células.

Ligante
Qualquer molécula que se liga de modo específico a receptores celulares, geralmente desencadeando uma resposta (contração, síntese, secreção); pode ser um hormônio, um neurotransmissor, um fator de crescimento etc.

Ligase
Enzima que liga os fragmentos de DNA da cadeia *lagging* na forquilha de replicação (*replication fork*). É a mesma enzima que fecha as falhas durante a reparação do DNA danificado por agentes químicos ou físicos.

---

*Essas proteínas se chamam laminas.

Linhagem celular
Células animais ou vegetais que podem ser mantidas indefinidamente em cultura.

Lise celular
Ruptura da membrana plasmática, geralmente pela ação de soluções hipotônicas, causando a liberação do conteúdo da célula e sua morte.

Lisosoma
Organela contendo enzimas hidrolíticas, com atividade máxima em pH ácido; a membrana do lisosoma tem bombas de H^- que acidificam o interior da organela.

Macrófago
Célula do tecido conjuntivo, especializada na defesa do organismo pela fagocitose de microrganismos.

Macromoléculas
Moléculas que são grandes e complexas, essenciais para a estrutura e o funcionamento das células. Algumas vezes, são constituídas de unidades ou monômeros. Inclui lipídios, proteínas, polissacarídeos e ácidos nucléicos.

Matriz citoplasmática
O mesmo que citosol; inclui todos os componentes do citoplasma que preenchem o espaço entre as organelas.

Matriz nuclear
É o endoesqueleto nuclear, constituído por um trançado de filamentos, que sustenta os cromosomas interfásicos.

Meiose
Divisão celular que, nos animais, origina os óvulos e espermatozóides, que possuem metade do número de cromosomas típicos da espécie; essencial para a reprodução sexuada; consiste em duas divisões celulares sucessivas, havendo duplicação dos cromosomas apenas uma vez, antes da primeira divisão.

Mesosoma
Invaginação da membrana plasmática de algumas bactérias.

Metabolismo
O conjunto do total de reações químicas que tem lugar nas células.

Micoplasmas
São bactérias muito pequenas e desprovidas de parede.

Microfilamentos
São os filamentos de actina, participantes dos movimentos celulares e encontrados em todas as células eucariontes. Fazem parte do aparelho contrátil das células musculares.

Microscópio confocal
Um tipo de microscópio que usa um delgado feixe de raios laser para fazer uma varredura em determinado plano da célula. Permite a realização de "cortes ópticos" e a reconstrução tridimensional das estruturas com o auxílio de um programa de computador.

Mitorribosoma
O ribosoma da mitocôndria, que é diferente dos ribosomas do citosol, porém muito semelhante aos ribosomas das bactérias.

Mitose
Fase do ciclo celular, quando os cromosomas se tornam bem visíveis no microscópio óptico e a célula se divide em duas células-filhas.

Mosaico fluido
Modelo proposto para as membranas celulares (universalmente aceito). Admite que as membranas são constituídas por uma bicamada lipídica, fluida, onde se inserem proteínas. As proteínas têm mobilidade no plano da membrana, mas os lipídios podem pular da camada lipídica interna para a externa, e vice-versa.

Movimento amebóide
Processo de movimentação de alguns tipos de células que emitem prolongamentos (pseudópodos) e assim se locomovem.

Necrose
Morte celular, geralmente por falta de oxigênio, por microrganismo patógeno ou por substância tóxica. A célula e as organelas aumentam de volume, ocorre a ruptura da célula e instala-se um processo inflamatório nos tecidos vizinhos.

Neurotransmissor
Molécula produzida nas sinapses do sistema nervoso que transmite o impulso nervoso de um neurônio para outro, ou para uma célula efetora.

Nucléolo
Estrutura do núcleo, constituída principalmente de RNA e proteínas, mas contendo também DNA, onde há transcrição de RNA ribosômico e montagem das duas subunidades dos ribosomas.

Oncogene
Gene mutante que participa da formação de células malignas (cancerosas); forma-se por mutação de genes que normalmente controlam a proliferação celular (proto-oncogene).

Oxidação fosforilativa
Processo de transferência de energia dos nutrientes para moléculas de ATP. Tem lugar na membrana das bactérias e na membrana interna das mitocôndrias. Os elétrons, provenientes da oxidação dos nutrientes, impulsionam a fosforilação de ADP para formar ATP.

Parede celular
Camada que protege e dá forma a certas células (bactérias, células vegetais, fungos e algas), situada por fora da membrana plasmática; não existe nas células dos animais.

Partícula beta
Partícula emitida por certos radioisótopos e que corresponde a um elétron.

Permutação
O mesmo que *crossing over*, ocorre na prófase I da meiose e consiste na troca de DNA entre um cromossoma materno e um cromossoma paterno.

Peroxisoma
Organela que utiliza O_2 para oxidar moléculas diversas; produz e degrada H_2O_2.

Pinocitose
Um tipo de endocitose em que pequenas quantidades de material são envoltas por depressão da membrana plasmática, que se separa e forma uma vesícula no citoplasma.

Placa celular
Tabique na altura do equador da célula vegetal, que se forma na telófase pela fusão de vesículas procedentes do aparelho de Golgi, para dividir a célula em duas.

Plasmídeo
Molécula circular de DNA, existente em células procariontes, que se duplica independentemente da duplicação do cromossoma bacteriano; os plasmídeos são muito usados como vetores (transportadores) de genes de um organismo para outro.

Polímero
Macromolécula constituída pela repetição de moléculas menores, denominadas monômeros.

Poliplóide
Célula cujo núcleo contém mais de dois conjuntos de cromossomas.

Polirribosoma
Conjunto formado por uma molécula de RNA mensageiro e os ribosomas a ela ligados, para sintetizar proteína.

Poro nuclear
Um canal, com estrutura em forma de cesta, que controla o intercâmbio de moléculas entre os dois principais compartimentos celulares: o núcleo e o citoplasma.

Primase
Enzima que sintetiza os pequenos fragmentos de RNA que são "primers" dos pedaços de DNA da cadeia "lagging" na forquilha de replicação; essa enzima é chamada também de DNA-primase (o "primer" da cadeia "leading" é sintetizado pela RNA-polimerase).

Proofreading
Capacidade da DNA-polimerase III de substituir as bases erradas pelas bases corretas durante a replicação da molécula de DNA.

Proteína G
Uma das proteínas transmissoras de sinais químicos da superfície para o interior da célula, ativada pela combinação reversível com GTP; foi uma das primeiras proteínas transmissoras de sinais a serem estudadas.

Proteína globular
Proteína com a molécula de forma globosa; o termo se refere à estrutura terciária da proteína, pois moléculas protéicas globulares podem se ligar formando filamentos (estrutura quaternária).

Proteína Ras
Uma das proteínas que transmitem sinais químicos da superfície celular para o citosol, e que se ativa pela ligação com GTP.

Proteína transmembrana
Uma proteína da membrana celular que atravessa toda a espessura da membrana, fazendo saliência tanto na superfície externa como na face citoplásmica da membrana.

Proteína transportadora
Componente das membranas celulares; sofre modificações tridimensionais ao se combinar com certas moléculas que atravessam as membranas, impulsionadas pela proteína transportadora.

Proteoglicana
Complexo de proteína-polissacarídeo, que consiste em uma molécula central de proteína à qual se prendem diversas cadeias de glicosaminoglicanas. As glicosaminoglicanas têm cargas negativas e prendem cátions aos quais se ligam numerosas moléculas de água. Assim se forma um gel muito rico em água e que resiste às compressões. As proteoglicanas são freqüentes no material extracelular.

Protoplasto
Uma célula bacteriana Gram-positiva, ou então uma célula vegetal, sem parede: a parede pode ter sido removida por enzimas, ou, no caso das bactérias, impedida de se formar pela ação de substâncias quimioterápicas ou de antibióticos. A célula perde sua forma característica e torna-se esférica.

Quimiotactismo
Resposta de uma célula móvel, procarionte ou eucarionte, que é atraída ou repelida por uma substância solúvel.

Radioautografia
Técnica com diversas variações e empregada para a detecção de átomos radioativos pela ação da radioatividade sobre as emulsões fotográficas. Geralmente, o átomo radioativo serve como marcador para uma molécula complexa.

Receptor
Proteína que, ao se ligar especificamente a certas moléculas, promove uma resposta celular; a molécula que se liga ao receptor se chama ligante ou sinal químico.

Recombinação genética
O mesmo que *crossing over*; é o rearranjo de genes que mudam de posição durante a meiose, como resultado da ruptura e reunião de segmentos dos cromosomas homólogos (um materno e o outro paterno).

Replicação
Duplicação dos filamentos de DNA pelas enzimas chamadas DNA-polimerases.

Respiração
O processo celular que consome oxigênio e libera gás carbônico.

Retículo endoplasmático liso
Sistema de membranas intracelulares, sem ribosomas, delimitando cisternas, e que têm a forma de tubos percorrendo quase todo o citoplasma. Funções variáveis conforme a célula. Destroem moléculas tóxicas, sintetizam hormônios esteróides e armazenam íons cálcio.

Retículo sarcoplasmático
Retículo endoplasmático liso das células ou fibras musculares; além de outras funções, é um reservatório de Ca^{2+}, que é lançado no citosol para promover a contração celular.

Retrovírus
Vírus com genoma de RNA que se multiplica nas células, fazendo primeiro uma cópia em DNA, graças às transcriptases reversas.

Rickéttsias
Células procariontes (bactérias) incompletas, que só vivem e proliferam no interior de células eucariontes: são parasitas intracelulares obrigatórios.

RNA heterogêneos
Também designados hnRNAs, é um grupo complexo de moléculas de RNA intranucleares, algumas muito grandes, e incluindo os pré-RNAs. Estes últimos, depois de processados por *splicing*, dão origem aos RNAs mensageiros.

RNA mensageiro
Ou mRNA, é a molécula intermediária entre um gene e o polipeptídeo codificado por ele. A molécula do RNA mensageiro é sintetizada sobre um filamento de DNA.

RNA-polimerase I
A enzima de transcrição encontrada nas células eucariontes que sintetiza os RNAs ribosômicos maiores (28S, 18S e 5,8S).

RNA-polimerase II
A enzima de transcrição encontrada nas células eucariontes que sintetiza os RNAs mensageiros e a maioria dos RNAs de moléculas pequenas.

RNA-polimerase III
A enzima de transcrição encontrada nas células eucariontes que sintetiza os RNAs de transferência e o RNA 5S dos ribosomas.

Sarcômero
Unidade contrátil dos tecidos musculares estriados; consiste, principalmente, em moléculas de miosina e de actina, compreendidas entre duas linhas Z, ao longo de uma estrutura filamentosa chamada miofibrila.

Satélite do cromosoma
Pequena porção de cromatina terminal, situada depois de uma constrição secundária, quando esta se localiza perto da ponta de um cromosoma (não confundir com DNA satélite).

Simbiose
União entre dois organismos que é benéfica para ambos.

Sinal químico
Molécula que é reconhecida por receptores celulares e que causa uma resposta na célula.

Sinapse
Local onde o axônio de um neurônio faz contato com um dendrito, com o corpo de outra célula nervosa ou com uma célula efetora; nas sinapses, o terminal axônico libera neurotransmissores que transmitem o impulso para a célula seguinte da cadeia. A secreção de neurotransmissores caracteriza as sinapses químicas. Nas sinapses elétricas (raras nos mamíferos), as membranas celulares se unem e o impulso nervoso é transmitido diretamente, sem a participação de neurotransmissores.

Síntese pré-biótica
Síntese realizada nos primórdios da Terra, antes do aparecimento das primeiras células.

Solução hipertônica
É a solução que retira água da célula.

Solução hipotônica
É a solução que promove a entrada de água na célula e, até mesmo, a ruptura das membranas das organelas e da membrana plasmática, havendo esvaziamento do conteúdo celular.

Solução isotônica
É a solução que não modifica o volume celular.

Splicing
Processo que tem lugar na molécula de um RNA precursor, pelo qual os íntrons são removidos e os éxons são soldados para formar uma molécula de RNA mensageiro.

Substrato
Molécula sobre a qual atua uma enzima.

Tampão
Solução contendo compostos que interagem com hidrogênio livre e com íons hidroxila, minimizando as alterações do pH.

Telômero
As extremidades do cromosoma, formadas por uma seqüência muito repetida de nucleotídeos.

Tilacóide
Espaço sacular delimitado por membrana, localizado no cloroplasto, que contém pigmento fotossintético e capta energia da luz; as pilhas de tilacóides são denominadas grana (singular granum).

Topoisomerases
Enzimas que desfazem as voltas das cadeias duplas de DNA para permitir a separação delas na replicação do DNA (duplicação semiconservadora das cadeias de DNA) e na transcrição (cópia da informação do DNA para molécula de RNA).

Tradução
Síntese de uma molécula protéica sob o comando da informação contida na molécula de um RNA mensageiro.

Transcrição
Síntese de RNA sobre um molde (*template*) de DNA, catalisada pelas enzimas denominadas RNA-polimerases ou transcriptases.

Transcriptase
Enzima que fabrica moléculas de RNA copiando um molde (*template*) de DNA no processo denominado transcrição.

Transcriptase reversa
Também chamada transcriptase inversa; enzima que sintetiza DNA copiando uma molécula de RNA; importante para a multiplicação dos vírus com genoma de RNA (retrovírus).

Transformadas
Células cultivadas que adquirem características de malignidade.

Transgênico
Um animal ou vegetal que incorporou ao seu genoma, de forma estável, genes provenientes de outro organismo, sendo capaz de transmitir esses genes aos descendentes.

Transporte ativo
Processo pelo qual uma substância se prende a uma proteína transmembrana e é transportada através da membrana, contra um gradiente eletroquímico, com gasto de energia.

Transporte passivo
Transferência de moléculas através de uma membrana da célula, a favor de um gradiente e sem gasto de energia.

Triacilglicerídeo
O mesmo que triglicerídeo ou gordura neutra; constituído por uma molécula de glicerol e até três moléculas de ácidos graxos.

Trício
Hidrogênio radioativo, H^3, emissor de elétrons de energia muito baixa, razão pela qual proporciona boa resolução nas radioautografias.

Tumor benigno
Tumor constituído por células que não obedecem aos controles normais da proliferação celular, mas que não invadem os tecidos vizinhos nem formam metástases.

Tumor maligno
O mesmo que câncer; crescimento clonal desordenado de uma célula, que invade as regiões vizinhas e origina células que se estabelecem e proliferam em órgãos distantes, formando as metástases.

Vírion
O vírus com sua estrutura completa, conforme ele existe fora das células; tem o genoma de ácido nucléico (RNA ou DNA), protegido por moléculas protéicas que constituem o capsômero; alguns têm um envelope por fora do capsômero.

Viróide
Difere dos vírus por ser constituído somente de uma molécula circular de RNA, sem qualquer camada protetora.

Zônula aderente
Uma junção aderente que, em vez da forma de um disco, é um cinto em volta da célula.

Zônula oclusiva
Especialização das membranas de células contíguas que estabelece uma vedação do espaço extracelular, assim, as células delimitam compartimentos separados, onde as moléculas só passam de um compartimento para o outro pela via intracelular.

Índice Alfabético

D